

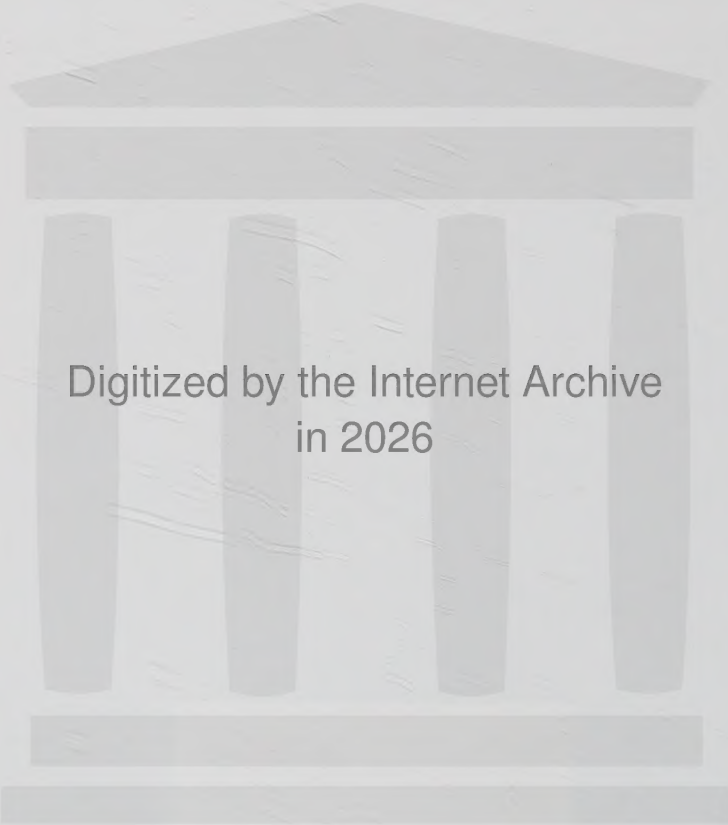
Kartierung von Strukturprotein-Genen des menschlichen Cytomegalovirus mit Hilfe monoklonaler Antikörper

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg
zur Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Barbara Nowak
aus Rheine

1984

Diese Arbeit erscheint in
VIROLOGY 132, 325 - 338 (1984)
VIROLOGY 134, 91 - 102 (1984)



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546207_0045

Kartierung von Strukturprotein-Genen des menschlichen Cytomegalovirus mit Hilfe monoklonaler Antikörper

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg
zur Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Barbara Nowak
aus Rheine

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen
Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 24.01.1984

Vorsitzender der Promotionskommission:

Professor Dr. K. Jacobs

Erstberichterstatte: Professor Dr. B. Fleckenstein

Zweitberichterstatte: Professor Dr. W. Heumann

Inhaltsverzeichnis

I.	<u>Einleitung</u>	1
II.	<u>Materialien</u>	9
1.	Zelllinien, Viren und Bakterien	9
2.	Reagenzien	9
3.	Lösungen und Puffer	11
4.	Enzyme, Nukleinsäuren, Immunglobuline	14
5.	Geräte und Laborhilfsmittel	15
III.	<u>Methoden</u>	18
1.	Zellkultur	18
2.	Virusinfektion	18
3.	Test auf Mycoplasmen	19
4.	DNA-Extraktion	19
5.	Transfektion viraler DNA	20
6.	Virustitration, Plaque-Reinigung und Neutralisations- test	20
7.	Virusreinigung	21
8.	Präparation von viralen Nukleocapsid- und Membran- proteinen	22
9.	Radioaktive Markierung von Zell- und Virusproteinen	22
a)	Markierung mit ^{35}S -Methionin	22
b)	Markierung mit ^{32}P -Orthophosphat	22
c)	Markierung mit ^3H -Glucosamin	23
d)	Markierung mit ^{125}J	23
e)	Markierung mit ^3H -Natrium-Borhydrid	23
10.	Elektronenmikroskopie	23
11.	Immunpräzipitation	24
12.	Ein- und zwei-dimensionale Gelelektrophorese	25
13.	Nachweis von Glycoproteinen mit ^{125}J -Concanavalin A	25
a)	Markierung von Con A mit ^{125}J	26
b)	Imprägnieren von Gelen	26

14.	Herstellung von monoklonalen Antikörpern	26
a)	Zellkultur	26
b)	Immunisierung der Mäuse	27
c)	Präparation der Maus-Milzzellen	27
d)	Zellfusion	27
e)	HAT-Selektion der Hybridzellen und Testen auf positive Klone	28
15.	Radioimmunotest	28
16.	Immunfluoreszenz	29
17.	Western-Blot Analysis	30
18.	Isolierung von RNA	31
19.	Fraktionierung von RNA im Saccharosegradienten	32
20.	Gelelektrophorese von RNA und Northern-Blot Hybridisierung	33
21.	In vitro Translation von RNA	34
22.	Hybrid-Selektion viraler RNA	34
23.	Isolierung von rekombinanter Plasmid- und Cosmid-DNA	35
24.	Subklonierung von viraler DNA in Plasmid-Vektoren	35
25.	Klonierung von viraler DNA in den Bakteriophagen M13	36
a)	Gelelution von viraler DNA	36
b)	Ligation und Transformation	37
c)	Reinigung von Plaques	37
d)	Aufziehen von Phagen	38
e)	Isolierung von ds und ss Phagen-DNA	38
f)	C-Test zur Identifizierung der Rekombinanten	38
26.	Gelelektrophorese von DNA und Southern-Blot Hybridisierung	39
a)	Acrylamid-Gelelektrophorese	39
b)	Agarose- Gelelektrophorese	39
27.	Radioaktive Markierung von DNA in vitro	40

IV.	<u>Ergebnisse</u>	41
A.	<u>Charakterisierung der Strukturproteine</u>	41
1.	Übersicht über die Strukturproteine	41
2.	Lokalisation der Proteine im Virion	47
3.	Identifikation der Glycoproteine	50
4.	Identifikation der Phosphoproteine	56
5.	Immunogene Eigenschaften der viralen Proteine	59
B.	<u>Monoklonale Antikörper gegen Strukturproteine des menschlichen Cytomegalovirus</u>	64
1.	Selektionsverfahren von monoklonalen Antikörpern	64
2.	Spezifität der monoklonalen Antikörper	67
C.	<u>Kartierung von Strukturprotein-kodierenden Genen</u>	81
1.	Zellfreie Translation von RNA aus infizierten Zellen	81
2.	Kartierung von viralen Genen über Hybridselektion und zellfreie Translation von viraler RNA	86
3.	Kodierende Sequenzen für phosphorylierte Virionproteine	91
4.	Transkripte für die viralen Proteine von 65 Kd und 71 Kd	94
V.	<u>Diskussion</u>	104
VI.	<u>Zusammenfassung</u>	112
VII.	<u>Verzeichnis der Abkürzungen</u>	114
VIII.	<u>Literaturverzeichnis</u>	115

I. Einleitung

Das menschliche Cytomegalovirus (HCMV) gehört neben dem Herpes-simplex-Virus (HSV), Epstein-Barr-Virus (EBV) und Varizella-Zoster-Virus (VZV) zur Familie der menschenpathogenen Herpesviren. Infektionen mit HCMV sind häufig. In den entwickelten Ländern sind 60-70% der erwachsenen Bevölkerung mit HCMV infiziert (Weller, 1970). Die Durchseuchung liegt bei nahezu 100% bei Populationen in wirtschaftlich unterentwickelten Regionen oder in tropischen Klimazonen (Weller, 1971; Lang, 1975). Auf Grund der Vielfalt teilweise schwerer Erkrankungen ist dieses Virus ein wichtiger menschlicher Krankheitserreger (Starr, 1979). Ungefähr ein Prozent aller Neugeborenen haben eine diaplazentare Infektion durchgemacht und scheiden HCMV im Urin aus. Etwa 10% dieser Gruppe weisen als Folge der Infektion Krankheitszeichen auf wie Mikrozephalie, Hepatosplenomegalie, Gelbsucht oder thrombopenische Purpura (Stagno et al., 1982). Im Laufe des weiteren Lebens können sich, auch bei Kindern, die bei der Geburt noch keine Symptome zeigten, psychomotorische Entwicklungsstörungen, Intelligenzdefekte und Schwerhörigkeit manifestieren (Hanshaw et al., 1975; Hanshaw and Dudgeon, 1978). Dagegen verlaufen perinatale und postnatale Primärinfektionen im gesunden Wirtsorganismus meist unbemerkt. Gelegentlich äußern sie sich in verschiedenen Syndromen mit Mononukleose (Klemola, 1973; Horwitz et al., 1977), Hepatitis (Reller, 1973) und Pneumonie (Klemola et al., 1972). Nach Infektion persistiert das HCMV wie andere Herpesviren im menschlichen Organismus und kann nach unspezifischen Stimuli wie zum Beispiel Schwangerschaft, immunsuppressive Therapie oder Fieber zu rekurrierenden Infektionen mit Sekundärerkrankungen führen. Bisher ist nicht bekannt, was der natürliche Persistenzort des Virus im Organismus ist. Möglicherweise sind es in erster Linie Zellen des blutbildenden Systems; in Lymphozyten und Granulozyten des peripheren Blutes kann das Virus gefunden werden (Joncas et al., 1975; Huang et al., 1978; Furukawa, 1979; Tocci and St. Jeor, 1979; Rinaldo et al., 1979). Patienten, deren Immunsystem durch Krank-

heit oder durch Therapie bei Krebserkrankungen und Organtransplantationen supprimiert wurde, entwickeln häufig lebensbedrohliche Allgemeininfektionen (Spencer, 1974; Abdallah et al., 1976; Simmons et al., 1977). Diese können sowohl nach Primärinfektion, als auch nach Reaktivierung des latenten Virus auftreten. Mehr als die Hälfte aller Empfänger von Knochenmark-Transplantaten erwerben eine HCMV-Infektion mit oft tödlichen Ausgang, unabhängig davon, ob der Patient Antikörper gegen HCMV im Serum besitzt (Saral, 1979; Meyers et al., 1980). Infektionen bzw. Reinfektionen mit HCMV spielen demnach eine wesentliche Rolle und sind mitbestimmend über Erfolg oder Mißerfolg einer Transplantation.

Eine zuverlässige und schnelle Methode zum Nachweis von HCMV gibt es bis heute nicht. Die gegenwärtige Diagnose einer HCMV-Infektion beruht auf Isolierung des Virus aus Speichel und Urin oder auf einen Nachweis von spezifischen Antikörpern im Serum. Auf der anderen Seite gibt es auch keine befriedigende Therapie einer HCMV-Infektion. Von einer Impfung mit abgeschwächten Viruspartikeln wurde bisher abgesehen, da HCMV als mögliches onkogenes Agens gilt.

Das Virus wurde als Ursache für verschiedene menschliche Krebserkrankungen in Betracht gezogen, wie für das Adenokarzinom des Kolons (Huang and Roche, 1978; Hashiro et al., 1979), das Prostata- und Cervixkarzinom (Melnick et al., 1978; Rapp and Geder, 1980), das Neuroblastom, der Wilmstumor (Wertheim and Voute, 1976) und das Kaposisarkom (Giraldo et al., 1980; Drew et al., 1982). Bei Kolonkarzinomen und Kaposisarkomen konnte in Tumorbiopsien virale DNA nach Hybridisierung zu gereinigter HCMV-DNA nachgewiesen werden. Neuere Untersuchungen zeigten jedoch, daß das virale Genom Sequenzen enthält, die zellulären Sequenzen homolog sind (Peden et al., 1982; Rüger et al., 1983). Hybridisierungsexperimente können somit zu falsch positiven Ergebnissen führen. Umfangreichere Hybridisierungen mit klonierten viralen DNA-Fragmenten konnten bisher nicht beweisen, daß menschliche Tumoren virale DNA-Sequenzen enthalten (Spector and Vacquier, 1983; Rüger et al.,

1983). Dennoch ist die potentielle Onkogenität des HCMV nicht von der Hand zu weisen. Transfektionsversuche mit klonierter viraler DNA zeigten, daß HCMV DNA-Sequenzen Nagetierzellen immortalisieren (Nelson et al., 1982; 1983).

Allen Mitgliedern der Herpesfamilie ist eine gemeinsame Morphologie zu eigen (Wildy et al., 1960). Der Innenkörper (Nukleocapsid) hat einen Durchmesser von etwa 100 nm und besteht aus 162 Kapsomeren, welche die Form eines Ikosaeders (20-Flächner) bilden. Im Nukleocapsid befindet sich ein elektronendichter, proteinhaltiger Kern, um den das lineare doppelsträngige DNA-Molekül gewickelt ist (Furlong et al., 1972). Die Größe des Genoms reicht von 129 Kilobasen (Kb) beim Katzenfisch-Herpesvirus (Chousterman et al., 1981) bis etwa 235 Kb beim HCMV, dem größten Vertreter der Herpesvirusgruppe (Geelen et al., 1978; DeMarchi et al., 1978; Lakeman and Osborn, 1979; Weststrate et al., 1980). Das Nukleocapsid wird im Kern der infizierten Zelle zusammengesetzt und erhält beim Austritt aus dem Zellkern von der inneren Kernmembran eine Hülle (Darlington and Moss, 1968; Schwartz and Roizman, 1969; Smith and De Harven, 1973). Die trilaminare Hüllmembran enthält Proteine, Glycoproteine, Lipide und auf der Oberfläche eine Vielzahl von kurzen Vorstülpungen (Roizman and Furlong, 1974). Der Raum zwischen Nukleocapsid und äußerer Hüllmembran stellt sich im Elektronenmikroskop als dichtes amorphes Material dar und wird als Tegument bezeichnet (Roizman and Furlong, 1974). Die Genomstrukturen der Herpesviren sind komplex und charakterisiert durch repetitive Sequenzen in Tandem-Orientierung, inverse Repetitionen und nicht-repetitive Sequenzen, die verschieden angeordnet sein können. Das HCMV-Genom setzt sich aus einem langen Segment (L) mit 195 Kb und einem kurzen Segment (S) mit 40 Kb zusammen. Jedes Segment enthält ein Paar inverser Repetitionen, das einen Strang nicht-repetitiver DNA einrahmt (Fleckenstein et al., 1982; Ebeling et al., 1983). Während der Virus-Replikation werden L und S in beiden Richtungen kombiniert, so daß präparierte HCMV-DNA vier Orientierungen

des Genoms in gleichen Mengen enthält (LaFemina and Hayward, 1980). Die Struktur des HCMV-Genoms entspricht somit der von HSV, allerdings sind keine Übereinstimmenden Sequenzen nachweisbar (Huang and Pagano, 1974).

Über die regulatorischen Schritte der Replikation von HCMV ist im Vergleich mit anderen Herpesviren, insbesondere mit HSV (Roizman and Morse, 1978), wenig bekannt. Zum Teil liegt es daran, daß HCMV im Gegensatz zu HSV Eigenschaften besitzt, die eine Charakterisierung mit klassisch genetischen Methoden erheblich erschweren. So weisen Cytomegaloviren eine enge Wirtsspezifität auf und replizieren nur in Zellen ihres ursprünglichen Wirts. HCMV repliziert bevorzugt in menschlichen embryonalen Lungenfibroblasten (HEL) oder menschlichen Vorhautfibroblasten (HFF). Weiter bewirkt eine Infektion von Zellen mit HCMV, selbst bei hoher Multiplizität der Infektion, eine Steigerung der Synthese von Wirtszell-DNA, RNA und Proteinen (St. Jeor et al., 1974; Furukawa et al., 1975; Tanaka et al., 1975; DeMarchi, 1976; Stinski, 1977). Hingegen führt eine Infektion mit HSV 1 und 2 zur Inhibition der Wirtszell-Proteinsynthese und folglich zu einer hauptsächlich viralen Proteinsynthese und Erleichterung der Identifizierung virusspezifischer Proteine (Honess and Roizman, 1973; 1974; Powell and Courtney, 1975). Ein weiteres Problem ist die langsame und ineffiziente Replikation von HCMV in Zellkultur (Furukawa et al., 1973; DeMarchi and Kaplan, 1977; Stinski, 1978). HSV repliziert und führt zur Bildung reifer Viruspartikel innerhalb von acht Stunden nach Infektion, HCMV benötigt jedoch 3-4 Tage.

Nach Infektion von menschlichen Zellen mit HCMV werden charakteristische cytopathogene Veränderungen beobachtet. Die infizierten Zellen entwickeln intranukleäre und intrazytoplasmatische Einschußkörperchen. Zytoplasmatische Einschlüsse beinhalten Viruspartikel, "Dense bodies" und Mikrotubuli. "Dense bodies" (DB-Partikel) sind umschriebene Körper, die von einer der Virushülle ähnlichen Membran umgeben sind, jedoch keine DNA enthalten (Sarav and Abady, 1975). Sie variieren in der Größe und haben etwa den zweifachen Durchmesser umhüllter Virionen. Craighead et

al. (1972) demonstrierten, daß Antikörper gegen HCMV auch mit DB-Partikeln Aggregate bildeten und vermuteten, daß Viruspartikel und DB-Partikel antigene Determinanten teilen. Das wurde von mehreren Forschungsgruppen bestätigt, die mit Hilfe von denaturierenden Proteingelen zeigen konnten, daß DB-Partikel und Viruspartikel die selben Strukturproteine, jedoch in unterschiedlichen Mengenverhältnissen enthalten (Sarav and Abady, 1975; Fiala et al., 1976; Kim et al., 1976; Stinski, 1976). Drei bis vier Tage nach HCMV-Infektion werden die Zellen größer und fusionieren gelegentlich (Cytomegalie). Deutliche cytopathogene Läsionen im infizierten Zellmonolayer treten zwischen dem 3.-24. Tag nach Infektion auf.

Während der produktiven Infektion ist die Genexpression des HCMV, ähnlich wie bei HSV, zeitlich reguliert und wird entsprechend in drei Phasen eingeteilt, in (a) die sehr frühe (immediate early, IE) Phase, welche unabhängig von neuer viraler Proteinsynthese einsetzt, (b) die frühe (early, E) Phase, welche die Aktivität von mindestens einem IE-Gen erfordert und (c) die späte (late, L) Phase, die nach der viralen DNA-Synthese beginnt (Stinski, 1978; Stinski et al., 1980; Blanton and Tevethia, 1981; DeMarchi, 1981; Wathen et al., 1981; 1982). Dabei werden mit fortschreitender Infektion immer größere Teile des HCMV-Genoms in die Transkription mit einbezogen (Chua et al., 1981). Während der IE-Phase der Infektion ist die Transkription überwiegend auf dem Genomabschnitt von etwa 0,06 bis 0,145 Karteneinheiten beim HCMV-Stamm AD169 begrenzt (McDonough and Spector, 1983; Jahn et al., 1984). Es konnte gezeigt werden, daß auch bei den Stämmen Towne und Davis die homologen Sequenzen für den größten Teil der IE-Transkripte kodieren (DeMarchi, 1981; Wathen et al., 1981; 1982). Die dominierende virale IE-RNA von 1,95 Kb kodiert für ein Protein, welches zunächst über in vitro Translation identifiziert wurde. Dieses Protein macht 90% der in vivo synthetisierten IE-Proteine aus und hat ein Molekulargewicht von 68 000 bis 75 000 (Stinski, 1978; Gibson, 1981; Wathen et al., 1981; Stinski et al., 1983). Seine Größe variiert leicht zwischen verschiedenen HCMV-

Stämmen (Gibson, 1981; Cameron and Preston, 1981). Die IE-Proteine von HCMV werden während der ersten vier Stunden nach Infektion synthetisiert. Eine Hemmung der virusspezifischen IE-Proteinsynthese mit Inhibitoren, wie Cycloheximid hat keinen Effekt auf die Transkription von IE-RNA, es wird jedoch die Synthese der E-RNA unterdrückt. Daher wird vermutet, daß die IE-Gene für ein oder mehrere virale regulatorische Proteine kodieren, welche die anschließende frühe Genexpression kontrollieren. Die frühen viralen RNAs (E-RNAs) werden in Anwesenheit eines Inhibitors der viralen DNA-Replikation synthetisiert und sind hauptsächlich in den langen repetitiven Sequenzen kodiert und in zwei Regionen des langen nicht-repetitiven DNA-Segments (Wathen and Stinski, 1982). Nach Beginn der DNA-Replikation werden späte Gene exprimiert, die größtenteils für die strukturellen Komponenten des Virions kodieren (Stinski, 1978; Stinski et al., 1980; DeMarchi, 1980; 1981; McDonough and Spector, 1983). Die DNA-Synthese beginnt ungefähr 12 Stunden nach HCMV-Infektion, erreicht aber ihr Maximum nicht vor 72 bis 96 Stunden nach Infektion (St. Jeor and Hutt, 1977; Stinski, 1978). Zu diesem Zeitpunkt treten auch die ersten infektiösen Viruspartikel auf. Fortlaufende Passagen von HCMV-Suspensionen führen zu einer zyklischen Produktion von infektiösen, aber auch defekten Virionen. Defekte Partikel sind in vielen Virussystemen beschrieben worden (Huang and Baltimore, 1977). Sie interferieren mit der Vermehrung des Standardvirus. Bei HCMV-Präparationen kann das Verhältnis von Partikeln zu infektiösen Einheiten mehrere Zehnerpotenzen betragen (10^1 bis $>10^3$) (Benyesh-Melnick et al., 1966; Stinski et al., 1979). Defekte Partikel von HCMV enthalten DNA-Moleküle, die sich in ihrer Nukleotidsequenz von der Standardvirus-DNA unterscheiden und im Molekulargewicht zwischen $40-120 \times 10^6$ liegen (Ramirez et al., 1979; Stinski et al., 1979). Durch Passagieren von hochtitrigem HCMV in niedriger Multiplizität wird die Bildung von defekten Partikeln weitgehend verhindert, und man erhält eine homogene Virus-Population mit DNA-Molekülen entsprechend 235 Kilobasen.

Über die späten Proteine, welche die Strukturkomponenten des HCMV-Partikels darstellen, wurde von vielen Autoren berichtet. Die Ergebnisse zeigen zum Teil große Diskrepanzen in Bezug auf die Anzahl der Strukturproteine, ihren Größen und Modifikationen. So berichteten Sarov und Abady (1975) von 23 Polypeptiden mit einem Molekulargewicht von 24,5 K bis 171 K. Fiala et al. (1976) fanden 20 Polypeptide (22 Kd bis >230 Kd) in gereinigten Viruspräparationen. Kim et al. (1976) verwendeten andere Techniken zur Virusisolierung und erhielten damit 33 Proteine in der Größe von 11 K bis 290 K. Eine Markierung der Virionproteine mit ^3H -Glucosamin ergab nach Auftrennung im Gel sechs Banden. Eine der glycosylierten Banden entsprach dem dominanten Strukturprotein von 66 Kd. Gupta et al. (1977) verglichen die Strukturproteine von vier HCMV-Stämmen und fanden ein nahezu identisches Proteinmuster in allen Stämmen mit 32 Polypeptiden in den Größen von 13,5 K bis 235 K. Die Untersuchungen von Stinski (1977) ergaben 35 Strukturproteine (12 Kd bis 200 Kd), von denen 9 Proteine glycosyliert erschienen. Zur Zeit gibt es noch keine Übereinstimmung über Zahl und Charakteristika der Proteinkomponenten des HCMV. Ein Grund dafür ist, daß von den Autoren heterogene Ausgangsmaterialien und verschiedene Methoden zur Analyse der Proteine verwendet wurden. Zum andern ist die Zahl der HCMV-Proteine mit Sicherheit groß, so daß bei der elektrophoretischen Auftrennung Polypeptidspezies, die in geringen Mengen vorkommen, von dominanten Proteinen überlagert werden können. Eine weitere Schwierigkeit besteht darin, frühe virale Proteine oder zelluläre Kontaminanten von viralen Strukturproteinen zu unterscheiden. Zusätzlich gibt es die Möglichkeit, daß Vorläufer- und Endproduktform desselben Proteins in das Virion inkorporiert werden.

Von besonderem Interesse sind die Glycoproteine der Herpesviren. Ergebnisse von Experimenten mit HSV und EBV zeigten, daß die viralen Glycoproteine Bestandteile der Hülle sind und wahrscheinlich als einzige virale Polypeptide auf der Oberfläche des Viruspartikels lokalisiert sind (Olshevsky and Becker, 1972; Roizman and Furlong, 1974; Müller-

Lantzsch et al., 1980; Edson and Thorley-Lawson, 1981). Die viralen Glycoproteine sind wesentlich an der Initiation der Infektion beteiligt. Mit temperatur-sensitiven HSV-Mutanten konnte demonstriert werden, daß in Abwesenheit des Glycoproteins gB die Penetration von HSV in die Wirtszelle nicht stattfindet (Manservigi et al., 1977; Sarmiento et al., 1979). Auch in der Plasmamembran von HSV-, EBV- oder HCMV-infizierten Zellen wurden virusspezifische Glycoproteine gefunden (Spear et al., 1970; Norrild et al., 1978; Edson and Thorley-Lawson, 1981; Stinski, 1976; 1977). Glycoproteine der Herpesviren induzieren die Bildung von neutralisierenden Antikörpern. In Rekonvaleszentenseren finden sich Antikörper, die sowohl mit der Zelloberfläche von infizierten Zellen reagieren (Norrild et al., 1979; 1980), als auch mit den Viruspartikeln und so die Neutralisierung des Virus bewirken (Pauls and Dowdle, 1967; Stalder and Ehrensberger, 1980). Bei HSV und EBV sind mehrere Glycoproteine, die an der Neutralisation beteiligt sind, identifiziert worden (Cohen et al., 1978; Para et al., 1982; Thorley-Lawson and Poodry, 1982). Entsprechende Glycoproteine konnten bei HCMV bislang nicht identifiziert werden.

Zu Beginn dieser Arbeit war noch für keines der Proteine des menschlichen Cytomegalovirus die kodierende DNA-Sequenz identifiziert worden. Hier sollte deshalb eine Methode entwickelt werden, welche die Kartierung von Genen viraler Strukturproteine ermöglicht. Zunächst wurde für die Vielzahl der Strukturproteine ihre Identität als Komponente des HCMV-Partikels nachgewiesen. Im Anschluß daran wurden monoklonale Antikörper gegen Strukturproteine hergestellt. Diese Antikörper reagierten auch mit den homologen in vitro synthetisierten Proteinen. An mehreren Beispielen konnte demonstriert werden, daß sich die Methode der Hybridselektion von RNA zu klonierter viraler DNA, in Verbindung mit in vitro Translation und Immunpräzipitation mit monoklonalen Antikörpern eignet, Strukturprotein-Gene auf dem HCMV-Genom zu lokalisieren.

II. Materialien

1. Zelllinien, Viren und Bakterien

- HFF: menschliche Vorhaut-Fibroblasten von bis zu 7 Tage alten Säuglingen
- P3X63-Ag8,653: Myeloma-Zelllinie von Balb/c Mäusen, erhalten vom Salk Institut, San Diego, Kalifornien
- HCMV: menschliches Cytomegalovirus
Stamm AD169 isoliert von Rowe et al. (1956).
Stamm Towne isoliert von Plotkin et al. (1975).
- E. coli: Escherichia coli
Stamm HB101 beschrieben von Boyer und Rouland-Dussoix (1969).
Stamm JM103 beschrieben von Messing et al. (1981).

2. Reagenzien

- Agarose Typ I, low melting agarose
Sigma, St. Louis, USA
- Ampholine
LKB und Serva
- Acrylamid, N-N-Methylenbisacrylamid (Bisacrylamid), Ammoniumperoxidsulfat (Ammoniumpersulfat), Bromphenolblau, β -Mercaptoäthanol, Natriumdodecylsulfat (SDS), N-N-N-N-Tetramethyläthylendiamin (Temed), Phosphorwolframsäure, Cäsiumchlorid, Ethidiumbromid, N-Laurylsarkosin
Serva, Heidelberg
- Bio-Gel P-10
Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA
- Concanavalin A (Con A), Chloramin T, Natriumbisulfit, Hämoglobin I
Sigma, München
- Fötale Kälberserum
Gibco, Glasgow

- Formvar
Zeiss, Deutschland
- D-Glucose
Serva, Heidelberg
- L-Glutamin
Fluka, Buchs, Schweiz
- Harnstoff, (Ammoniumfrei)
Schwarz, Mann. Inc. USA
- Kaninchen-Retikulozyten-Lysat, (RRL)
Amersham International, England
- D-Mannose
Serva, Heidelberg
- Meerschweinchen-Komplement
Behringwerke AG, Marburg
- Methylzellulose
Fluka, Buchs, Schweiz
- Molekulargewichtsmarker für Proteingele
Carbonic Anhydrase, Phosphorylase A, Trypsin Inhibitor, β -Galactosidase, Myosin, Lysozym
Sigma, München
Albumin, Katalase
Serva, Heidelberg
- Nonidet P-40, (NP40)
Fluka, Buchs, Schweiz
- Oligo(dT) Cellulose
Bethesda Research Laboratories GmbH, Neu-Isenburg
- PIPES [Natrium-Piperazine-N,N'-bis(2-Äthansulfonsäure)]
Sigma, München
- PPO, (2,5-Diphenyloxazol)
Koch Light Laboratories Ltd., Colbrook, England
- Radioisotope
¹²⁵J-Bolton-Hunter-Reagenz (etwa 2000 Ci/mmol), New England Nuclear

- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ (3000 Ci/mmol), New England Nuclear
- D- $[6\text{-}^3\text{H}]\text{Glucosamin}$ (30,3 Ci/mmol), Amersham Buchler, Braunschweig
- L- $[^{35}\text{S}]\text{Methionin}$ (800 Ci/mmol), Amersham Buchler, Braunschweig
- $^3\text{H-NaBH}_4$ (5,6 Ci/mmol), New England Nuclear
- $^{125}\text{J-Natriumjodid}$ (11-17 mCi/ $\mu\text{g J}$), Amersham Buchler, Braunschweig
- $^{32}\text{P-Orthophosphat}$ (200 mCi/mmol), Amersham Buchler,
- $^{125}\text{J-Protein A}$ (>30 mCi/mg), Amersham, Illinois, USA
- Sephadex G50, Ficoll
Pharmacia, Freiburg
- alle weiteren Substanzen ohne speziellen Bezugsnachweis
Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma (München).

3. Lösungen und Puffer

- Medien
MEM, RPMI 1640, NCTC 109 von
Grand Island Biological Company, Buffalo, USA
- MEM, Methionin-frei
Seromed, München
- Trypsin, Difco Laboratories, Detroit, USA
0,25% Trypsin; 0,1% D-Glucose; 8 g/l NaCl; 0,4 g/l KCl; 0,1 g/l
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,1% Phenolrot; 3 g/l Tris-HCl; pH 7,6
- VSB (virus standard buffer)
0,05 M Trishydroxymethylaminomethan (Tris); 0,012 M KCl; 0,005 M
Äthylendiaminotetraessigsäure-Dinatriumsalz (EDTA); pH 7,8
- PBS (phosphate buffered saline)
8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g KH_2PO_4 ; 0,134 g
 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ad 1000 ml Aqua dest.
- HBS (HEPES-buffered saline)
130 mM NaCl; 5mM KCl; 0,7 mM Na_2HPO_4 ; 0,1% Glucose, 40 mM HEPES;
pH 7,5
- Methylzellulose-Medium
2% Methylzellulose, 1 x MEM

- Tris-Salinepuffer

0,15 M NaCl; 0,05 M Tris-HCl; pH 7,5

- Lysispuffer

50 mM Tris-HCl; pH 8,0; 5 mM EDTA; 150 mM NaCl; 0,5% Nonidet-P40

- STENN-Puffer

50 mM Tris-HCl; pH 7,4; 5 mM EDTA; 0,5 M NaCl; 1% NP40; 5% Saccharose

- TEN-Puffer

10 mM Tris-HCl; pH 7,4; 1 mM EDTA; 50 mM NaCl

- SDS-Proben-Puffer

62,5 mM Tris-HCl; pH 6,8; 2% SDS (w/v); 10% Glycerin (v/v); 5% β -Mercaptoäthanol (v/v); 0,001% Bromphenolblau (w/v)

- Trenn-Gel

10%; 12,5% oder 15% Acrylamid/0,13% Bisacrylamid mit 0,0375% Ammoniumpersulfat; 0,075% TEMED; 0,1% SDS in 0,370 M Tris-HCl; pH 8,8

- Sammel-Gel

5% Acrylamid; 0,14% Bisacrylamid; 0,05% Ammoniumpersulfat; 0,2% TEMED in 0,124 M Tris-HCl; pH 6,8

- Laemmli-Elektrophorese-Puffer

25 mM Tris; 198 mM Glycin; 0,1% SDS

- Äquilibrationpuffer

0,0625 M Tris-HCl; pH 6,8; 50 mM DTT (Dithiothreitol); 2,3% SDS

- Puffer A

150 mM NaCl; 0,1% NaNO_3 ; 50 mM Tris-HCl; pH 7,5; 0,5 mM CaCl_2 ; 0,5 mM MnCl_2

- Elektrophorese-Puffer (f. Western-Blot)

25 mM Tris-HCl; pH 8,3; 192 mM Glycin; 20% Methanol

- Blockierungspuffer

0,9% NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 3% BSA (Rinderserum-Albumin)

- Färbelösung (f. Western-Blot)

10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 0,2 mg/ml O-Dianisidin (Fluka AG, CH-Buchs); 0,03% H_2O_2

- Guanidinium-Hydrochlorid-Puffer, pH 6,5
6 M Guanidinium-Hydrochlorid; 50 mM Lithiumcitrat, pH 6,5; 0,1 M β -Mercaptoöthanol; 0,5% N-Lauroylsarkosin
- TES-Puffer
20 mM Tris-HCl; pH 7,4; 1 mM EDTA; 0,1% SDS
- Proteinase K-Extraktionslösung
10 mM Tris-HCl; pH 7,4; 10 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,5% SDS; 100 μ g/ml Proteinase K (Merck).
- Chisam
Chloroform-Isoamylalkohol, 24 : 1
- Formix
9,8 ml deionisiertes Formamid; 0,1 ml 1M Tris-HCl; pH 7,5; 0,1 ml 100 mM EDTA
- AGB-Puffer, 10fach konzentriert
100 mM Tris-HCl; pH 7,5; 1 M LiCl_2 ; 10 mM EDTA; 5% SDS
- 5% Saccharose (20% Saccharose) -Formamid
10 ml 10fach AGB-Puffer; 33,3 ml 15% Saccharose in H_2O (33,3 ml 60% Saccharose in H_2O); 6,6 ml H_2O ; 50 ml deionisiertes Formamid
- MOPS-Puffer
20 mM Morpholinopropansulfonsäure (Sigma); 5 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA; pH 7,0 mit NaOH
- SSC, 1fach
150 mM NaCl; 15 mM Natriumcitrat
- Hybridisierungslösung
50% Formamid; 5 x SSC; 1 x Denhardt's Lösung; 0,1 mg/ml Hefe RNA; 0,1% SDS; 20 mM Natriumphosphat; pH 7,0
- STET-Lysispuffer
50 mM Tris-HCl; pH 8,0; 50 mM EDTA; 8% Saccharose; 5% Triton X-100
- Lysozymlösung
50 mM Tris-HCl; pH 8,0; 10% Saccharose; 1% Lysozym
- Tris-Sarkosyl
20 mM Tris-HCl; pH 8,5; 1% Sarkosyl

- T4 DNA-Polymerase-Puffer, 10fach
0,33 M Tris-Acetat; pH 7,9; 0,66 M Kalium-Acetat; 0,1 M Magnesium-Acetat; 5 mM DTT
- TCM-Puffer
10 mM Tris-HCl; pH 7,5; 10 mM CaCl_2 ; 10 mM MgCl_2
- LB-Medium (Difco)
10 g Bacto-Trypton; 5 g Bacto-Yeastextract; 8 g NaCl ad 1000 ml Aqua dest.; pH 7,2 mit NaOH
- LB-Agar
LB-Medium plus 15 g/l Bacto Agar (Difco)
- Elektrophoresepuffer für DNA-Acrylamid-Gele
40 mM Tris-HCl; pH 8,3; 5 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA
- TA-Puffer, 50fach
40 mM Tris-HCl; pH 7,8; 5 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA
- TE-Puffer
10 mM Tris-HCl; pH 7,5; 1 mM EDTA
- Ligationspuffer
50 mM Tris-HCl; pH 7,6; 10 mM MgCl_2 ; 10 mM DTT; 1 mM ATP; 10 $\mu\text{g/ml}$ BSA und 0,8 Einheiten an T4 DNA Ligase (NEN)
- YT-Medium
8 g Bacto-Trypton (Difco); 5 g Bacto-Yeast (Difco), 5 g NaCl ad 1000 ml Aqua dest.
- IPTG (Isopropyl- β -D Thiogalactopyranosid), Calbiochem
100 mM in Aqua dest.
- Xgal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid), Sigma
2% Xgal in Dimethylformamid
- Agar, soft, bzw. YT-Agarplatten
YT-Medium plus 6 g/l Bacto Agar (Difco), bzw. 15 g/l Bacto Agar

4. Enzyme, Nukleinsäuren, Immunglobuline

- Restriktionsendonukleasen
EcoRI aus E. coli; Boehringer, Mannheim

- BamHI aus *Bacillus amyloliquefaciens* H
HindIII aus *Haemophilus influenzae*
beide Bethesda Research Laboratories, Neu-Isenburg
- Galaktose-Oxidase
Millipore Corporation, Freehold, USA
 - Neuraminidase von *Vibrio cholerae*
Calbiochem, USA
 - Hefe-RNA, Kalbsleber-tRNA, DNA-Polymerase I aus *E. coli*
Boehringer, Mannheim
 - T4-Ligase
New England Biolabs
 - DNase I
Worthington Diagnostics, Freehold, USA
 - Alkalische Phosphatase
Bethesda Research Laboratories, Neu-Isenburg
 - Fluorescein konjugiertes Anti-Maus IgG
Miles-Yeda Ltd, alle anderen Immunglobuline von Nordic Immunology, USA

5. Geräte und Laborhilfsmittel

- Zellkultur-Zubehör
Nunc, Falcon, Lux; Petrischalen von Greiner, Nürtingen; Mikrotiter-platten von Costar
- CO₂-Inkubator
Wedco, Incorp., Silver Spring, Maryland, USA
- Sterilbank (Hood)
Ceag Schirp, Bork, Westfalen
- Durchlichtmikroskop
Diavert, Leitz
- Elektronenmikroskop EM 10 und Zubehör
EM 10 von Zeiss; Kupfernetze von Veco, Solingen; Scientia-Filme von Agfa Gevaert, Leverkusen
- Refraktometer von Zeiss

- Ultrazentrifugen
L-3 50, L-5 50 mit Rotoren SW27, SW41 und 50 ti; Airfuge
Beckman Instruments
- Zentrifugen
J6B mit Rotor JS-4.2 von Beckman Instruments; RC-2B mit Rotoren SS34
und GSA von Sorvall; Mikrofuge von Eppendorf
- Spektralphotometer
PMQII, Zeiss; Typ 250 Gilford
- Elektrophoreseausrüstung
im hiesigen Institut selbstgebaut von E. Fischer
- Spannungsgeräte
Höfer Scientific Instruments, USA; Biotec, Schweiz
- Mikrodensitometer 3C5
Joyce-Loebl, England
- Filterpapier 3 MM
Whatman, England
- Szintillationszähler
LS 7500 Beckman, Gamma 4000 Beckman
- Beschallgeräte
Bronson Sonic Power Company, Danbury, Connecticut, USA
- Röntgenfilme, X-Omat AR, Definium medical
Eastman Kodak Company, Rochester, USA
- Thermostat 5320
Eppendorf, Deutschland
- Schüttelwasserbad R 76
New Brunswick Scientific, Edison, N. J., USA
- Visking Dialyseschlauch
Serva, Heidelberg
- Nitrozellulose-Filter
Schleicher und Schüll oder Millipore
- Gefriertruhen
Revco, Harris, USA; Colora, Stuttgart

- Polaroid Landkamera MP 4, Filme Typ 665 und 107
Polaroid Corporation, Cambridge, USA
- Gelrockner für Polyacrylamid-Gele
Höfer Scientific Instruments, San Francisco, USA
- Spritzen, Kanülen
Pharmaplast, Braunschweig

III. Methoden

1. Zellkultur

Das menschliche Cytomegalovirus (HCMV) wurde auf menschlichen Vorhaut-Fibroblasten (HFF) gezüchtet. Zur Gewinnung der Fibroblasten wurden Vorhäute von bis zu 7 Tage alten Säuglingen verwendet. Die Vorhäute wurden steril zerkleinert und für mindestens 15 Minuten bei 37°C in einer 0,25% Trypsinlösung gerührt. Der Überstand wurde abgegossen, fötales Kälberserum (FKS) (Endkonzentration etwa 10%) zugegeben, und die Zellen wurden 10 Minuten bei 800 rpm abzentrifugiert. Die Zellen wurden einmal mit Kulturmedium (MEM) gewaschen und anschließend in einer Dichte von 5×10^6 Zellen/25 cm² Fläche ausgesät. Die Zellen wurden in MEM mit 0,35 g/l L-Glutamin und 5% FKS gezogen. Nach 4 Tagen wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt und nach weiteren 3 Tagen passagiert. Die als Monolayer wachsenden Zellen wurden in Standard-Gewebekulturflaschen aus Plastik bei 37°C kultiviert und nach dem Passagieren für 24 Stunden in einem Inkubator bei 5 Vol% CO₂-Konzentration gehalten. Zur Aufbewahrung wurden die Fibroblasten nach dem Trypsinieren und Waschen in MEM mit 0,3% Glucose, 10% DMSO, 75% FKS resuspendiert und in Plastik-Ampullen in flüssigen Stickstoff eingefroren.

2. Virusinfektion

Ein 2-3fach Plaque-gereinigtes Cytomegalovirus (Stamm Towne oder Stamm AD169) wurde für alle Experimente verwendet. Für eine Infektion wurden subkonfluente HFF mit 0,5-2 Plaque-bildenden Einheiten (PFU) pro Zelle infiziert. Nach einer Stunde bei 37°C wurde auf die infizierten Kulturen MEM mit 2% FKS gegeben. In der Regel wurde die Infektion ein bis zwei Tage nach dem Passagieren der Zellen durchgeführt. Mock-infizierte Zellen wurden identisch behandelt, jedoch ohne Zugabe von Virus.

3. Test auf Mycoplasmen

Die HFF-Kulturen wurden nach der Methode von Brown und Officer (1968) auf Kontamination mit Mycoplasmen getestet. Zusätzlich wurden Verunreinigungen mit Mycoplasmen über die DNA-Analyse ausgeschlossen. Die DNA von Zellkulturen (infiziert oder nicht-infiziert) und Virusstocks wurde im CsCl-Dichtegradienten analysiert (s. III.4). Auf Grund ihrer unterschiedlichen Dichten, ließen sich virale DNA ($1,715-1,717 \text{ g/cm}^3$) (Huang et al., 1973; Kilpatrick and Huang, 1977; Geelen et al., 1978; Ebeling et al., 1983), zelluläre DNA ($1,700 \text{ g/cm}^3$) (Maio, 1971) und DNA von Mycoplasmen ($1,685 \text{ g/cm}^3$) (Sober, 1970) im Gradientenprofil erkennen. Bei einem Mycoplasmen-DNA Peak wurden die Zellkulturen verworfen und das Virus über virale DNA-Transfektion von Mycoplasmen gereinigt.

4. DNA-Extraktion

Sedimente von nicht-infizierten oder infizierten Zellen und gereinigtes Virus von mehreren Virusreinigungen wurden in Virus-Standard-Puffer (VSB) resuspendiert. Nach einstündiger Lyse mit 2% Sarkosyl NL bei 56°C wurde die Suspension mit CsCl in $0,1 \times \text{SSC}$ und $0,02 \text{ M EDTA}$ auf eine Dichte von $1,700 \text{ g/cm}^3$ eingestellt. Die isopyknische Gleichgewichtszentrifugation wurde in einem Spinco 50 ti Rotor bei $30\,000 \text{ rpm}$, 20°C für 60 Stunden durchgeführt. Anschließend wurde das Zentrifugenröhrchen am Boden mit einer Nadel ($\emptyset 1,2 \text{ mm}$) angestochen und der Gradient in 20-25 Fraktionen ausgetropft. Die Dichte jeder Fraktion wurde über den refraktiven Index, der DNA-Gehalt jeder Fraktion durch Extinktionsmessung im UV-Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. HCMV-DNA-haltige Fraktionen wurden vereinigt und über Nacht mit mehrmaligem Pufferwechsel gegen $20 \text{ mM Tris pH } 8,5$ bei 4°C dialysiert. Die Reinheit und Konzentration der erhaltenen DNA wurde durch Messung der UV-Adsorption zwischen 220 und 320 nm im Gilford Spektralphotometer bestimmt. Zusätzlich wurde die DNA über Spaltung mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und

EcoRI (entsprechend den Angaben des Herstellers) und Auftrennung im 0,6% Agarose-Gel überprüft.

5. Transfektion viraler DNA

Für die Transfektion von viraler DNA wurde die Calciumphosphat Copräzipitations-Methode (Graham and van der Eb, 1973; 1974) in modifizierter Form angewandt. Etwa 1-3 µg virale DNA wurden mit Lachsspermien-DNA auf eine Endkonzentration von 10 µg DNA/ml HBS-Puffer eingestellt. Nach Zugabe von CaCl_2 (0,125 M Endkonzentration) und Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur bildete sich ein feines Präzipitat. Jeweils 2×10^6 HFF wurden mit 0,5 ml des DNA Präzipitats inokuliert, ohne daß das Kulturmedium entfernt wurde. Nach 4 Stunden bei 37°C im CO_2 -Inkubator wurden die Kulturen zur Erhöhung der Transfektionseffizienz mit 20% Glycerol behandelt, wie von Copeland und Cooper (1979) beschrieben. Jeden dritten Tag wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt. Erste cytopathogene Veränderungen wurden nach 8-12 Tagen beobachtet.

6. Virustitration, Plaque-Reinigung und Neutralisationstest

Die Anzahl der infektiösen Partikel einer Virussuspension wurde im Plaquetest bestimmt. Dafür wurden 10^6 HFF-Zellen auf Plastik-Petrischalen (50 mm im Durchmesser) ausgesät und nach 24-48 Stunden mit verschiedenen Verdünnungen an Virus infiziert. Nach zwei Tagen wurden die infizierten Zellmonolayer mit MEM/5% FKS plus 2% Methylzellulose überschichtet. Nach 14tägiger Inkubation unter 5% CO_2 waren die vom Virus lysierten Zellen als Plaques erkennbar und wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Anzahl der Plaques wurde auf die ursprüngliche Konzentration der Virionen in 1 ml der unverdünnten Suspension zurückgerechnet und der Titer in PFU/ml angegeben.

Für die Virusinfektion wurden genetisch reine Virusstocks, welche sich von einem einzigen infektiösen Viruspartikel ableiten, verwendet. Dazu

wurden 10^6 HFF-Zellen auf Plastik-Petrischalen mit 5-10 PFU infiziert und mit Methylzellulose (s. o.) überschichtet. Nach 14 Tagen wurde ein einzelner Plaque aufgenommen, verdünnt, und mit einem Teil davon wurden erneut 10^6 Zellen infiziert. Die Plaque-Reinigung erfolgte zwei- bis dreimal. Das gereinigte Virus wurde vermehrt und als Virusstock im flüssigen Stickstoff aufbewahrt.

Monoklonale Antikörper und Antiseren wurden auf neutralisierende Aktivität untersucht. Mediumüberstand (0,5 ml) von einer Hybridoma-Zelllinie, bzw. 0,5 ml von 1:200 verdünntem Antiserum wurden mit 10^1 , 10^2 und 10^3 infektiösen HCMV Partikeln und Meerschweinchen-Komplement inkubiert. Nach zwei Stunden bei 37°C im CO_2 -Inkubator wurden subkonfluente HFF-Monolayer mit den Virussuspensionen infiziert. Zwei Tage später wurden die infizierten Zellmonolayer mit Methylzellulose (s. o.) überschichtet und nach weiteren 14 Tagen die Plaques gezählt.

7. Virusreinigung

Bei einem cytopathogenen Effekt (CPE) von 80-90% wurde das Virus geerntet. Die am Boden der Kulturflaschen haftenden Zellen wurden abgeschabt und zusammen mit dem Kulturmedium 15 Minuten bei 3000 rpm abzentrifugiert. Das Zellkonzentrat wurde bei 4°C aufbewahrt. Das Virus im Überstand wurde für 90 Minuten bei 4°C und 20 000 rpm im Spinco SW27 Rotor sedimentiert, anschließend in VSB resuspendiert, in einem Dounce-Homogenisator aufgeschlossen und auf einen Saccharosegradienten (15-35%, w/v) geschichtet. Das bei 4°C aufbewahrte Zellkonzentrat wurde hypotonisch aufgebrochen, homogenisiert, 5 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert und der Überstand ebenfalls auf einen Saccharosegradienten geschichtet. Nach Zentrifugation der Gradienten im SW27 Rotor für 30 Minuten bei 4°C und 20 000 rpm wurden die Virusbanden in SW27 Zentrifugenröhrchen ausgetropft, mit VSB aufgefüllt, und das Virus wurde sedimentiert (90 Minuten, 4°C , 25 000 rpm). Das konzentrierte Virus aus dem Zellzytoplasma oder dem Kulturmedium wurde getrennt in VSB, Tris-Saline

oder PBS resuspendiert und vorübergehend bei -85°C aufbewahrt. Das durch die Saccharosegradienten sedimentierte Virusmaterial wurde ebenfalls resuspendiert und eingefroren.

8. Präparation von viralen Nukleocapsid- und Membranproteinen

Nukleocapsid- und Membranproteine wurden nach einer modifizierten Methode von Dolyniuk et al. (1976) präpariert. Gereinigtes, ^{35}S -markiertes Virus wurde in Tris-Saline-Puffer resuspendiert. Zu einem Teil wurde NP40 und Natriumdeoxycholat in einer Endkonzentration von 0,5% (v/v) gegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 4°C wurde die Suspension in einer Beckman Airfuge für 15 Minuten zentrifugiert. Die löslichen Proteine im Überstand, das resuspendierte Nukleocapsidsediment und der Teil mit unbehandelten Virionen wurden auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel analysiert.

9. Radioaktive Markierung von Zell- und Virusproteinen

a) Markierung mit ^{35}S -Methionin

Nicht-infizierte Zellen und mit HCMV infizierte Zellen wurden, je nach Fragestellung, für 24 Stunden innerhalb des 8 Tage dauernden Infektionszykluses parallel markiert. Von den Kulturen wurde das Medium abgegossen und durch Methionin-freies MEM/5% FKS mit ^{35}S -Methionin (50 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$, 1200 Ci/mmol) ersetzt. Die Zellen wurden nach der Markierungszeit mit PBS gewaschen, in PBS abgeschabt und abzentrifugiert. Die Sedimente wurden bei -20°C eingefroren oder sofort weiterverwendet. Für die Markierung von Virus wurden infizierte Zellkulturen während der späten viralen Protein-synthesephase (ab dem 4. Tag nach Infektion) mit 50-100 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ^{35}S -Methionin in Methionin-freiem MEM markiert. Das Virus wurde gereinigt, wie in III.7 beschrieben.

b) Markierung mit ^{32}P -Orthophosphat

Für die Markierung von Proteinen mit ^{32}P -Orthophosphat (200 mCi/mmol)

wurden die Kulturen behandelt, wie in Abschnitt 9.a) beschrieben. Die Kulturen wurden in vollständigem MEM/2% FKS mit 50 $\mu\text{Ci/ml}$ ^{32}P -Orthophosphat inkubiert.

c) Markierung mit ^3H -Glucosamin

Für eine in vivo Markierung der Glycoproteine wurden infizierte oder nicht-infizierte Zellkulturen in vollständigem MEM/2% FKS mit 100 $\mu\text{Ci/ml}$ D- 6- ^3H -Glucosamin (30,3 Ci/mmol) inkubiert und die Zellen oder das Virus geerntet.

d) Markierung mit ^{125}J

Proteine von gereinigten und beschallten Viruspartikeln wurden in vitro mit ^{125}J markiert. Dazu wurde das ^{125}J -Bolton-Hunter-Reagenz (2200 Ci/mmol) verwendet und entsprechend den Angaben des Herstellers verfahren (Bolton and Hunter, 1973; Bolton et al., 1976).

e) Markierung mit ^3H -Natrium-Borhydrid

Virale Oberflächen-Glycoproteine wurden nach einer modifizierten Galaktose-Oxidase Methode (Baumann and Doyle, 1978) in vitro markiert. Gereinigte Viruspartikel wurden in 1 ml Dulbecco's PBS aufgenommen und in zwei Proben geteilt. Zu einem Teil wurden 10 U/ml Neuraminidase und 4 U/ml Galaktose-Oxidase gegeben. Nach 45 Minuten bei Raumtemperatur wurden die oxidierten Zuckerreste mit 0,5 mCi ^3H - NaBH_4 (5,6 Ci/mmol) reduziert. Mit der zweiten Probe wurde entsprechend verfahren, jedoch ohne Zugabe von Enzymen, um mögliche unspezifische Markierungen mit ^3H - NaBH_4 zu sehen. Das Virus wurde einmal mit einem 60fachen Volumen an PBS gewaschen.

10. Elektronenmikroskopie

Für die Elektronenmikroskopie wurden Kupfernetzchen mit 0,4% Formvar in Dioxan befilmt, getrocknet und anschließend mit Kohlenstoff bedampft und beglimmt. Diese Netzchen wurden für die Negativ-Kontrastierung verwendet.

Als Kontrastmittel wurden Phosphorwolframsäure (2%ig, pH 7,2 und einigen Saccharosekörnern versetzt) oder Uranylacetat (2%ig, pH 4,2-4,4) verwendet. Die Netzchen wurden mit der glänzenden Seite nach oben für mindestens 20 Sekunden auf einen Tropfen einer Viruspräparation gelegt. Sodann wurden die Netzchen auf einem Filterpapier etwas abgetupft und auf einen Tropfen Kontrastmittel für 15-60 Sekunden gelegt. Das überschüssige Kontrastmittel wurde mit Filterpapier abgesaugt, und die Netzchen wurden vor der Betrachtung im Elektronenmikroskop für eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet.

11. Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation wurde im wesentlichen nach der von Sarnow et al. (1982) beschriebenen Methode durchgeführt. Radioaktiv markierte Zellpellets oder Viruspräparationen wurden mit 0,2-1 ml Lysispuffer für 20 Minuten auf Eis lysiert. Die Suspensionen wurden dann zweimal für 10 Sekunden beschallt und in einer Eppendorffzentrifuge bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Extrakte, die zusätzlich mit 1% SDS und 8 mM β -Mercapto-äthanol behandelt worden waren, wurden vor der Immunpräzipitation 20fach verdünnt. Die Überstände wurden mit präpariertem *Staphylococcus aureus* Stamm Cowan I (präpariert nach Kessler, 1975) vorinkubiert. Nach 10 Minuten auf Eis wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 12 000 g für eine Minute sedimentiert. Der Überstand wurde mit dem gewünschten Antiserum für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurden 50 μ l vom präparierten *S. aureus* zugegeben. Nach weiteren 10 Minuten auf Eis wurde der Bakterien-Immunkomplex sedimentiert. Das Konzentrat wurde dreimal mit STENN-Puffer gewaschen, einmal mit TEN-Puffer und anschließend im SDS-Proben-Puffer (Laemmli, 1970) resuspendiert. Durch dreiminütiges Kochen wurden die Bakterien vom Immunkomplex gelöst und durch anschließende Zentrifugation (1 Minute, 12 000 g) abgetrennt. Der Antigen-enhaltene Überstand wurde über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) analysiert.

12. Ein- und zwei-dimensionale Gelelektrophorese

Proteine von Zellextrakten und Virionen wurden im ein-dimensionalen linearen SDS-Polyacrylamid-Gel (Laemmli, 1970; Bodemer et al., 1980) aufgetrennt. Das Trenn-Gel (18 cm x 13 cm x 0,75 mm) wurde aus einer 10%, 12,5% oder 15% Acrylamid-/0,13% Bisacrylamid-Lösung gegossen. Auf das Trenn-Gel wurde nach Polymerisation ein Sammel-Gel geschichtet. Alle Proteinproben wurden vor dem Auftragen für 3-5 Minuten im SDS-Proben-Puffer (Laemmli, 1970) auf 95°C erhitzt. Der Lauf erfolgte im Laemmli-Elektrophorese-Puffer bei konstanter Stromstärke (max. 30 mA). Die Proteine wurden nach dem Lauf im Gel fixiert und gefärbt (0,2% Coomassieblau, 50% Methanol, 7,5% Eisessig) und mit der gleichen Lösung ohne Coomassieblau entfärbt. Gele, die ^3H -Glucosamin oder ^{35}S -Methionin enthielten wurden nach der Methode von Bonner und Laskey (1974) fluorographiert. Gele mit $^{32}\text{PO}_4$ oder ^{125}J wurden direkt nach dem Färben getrocknet. Für die anschließende Autoradiographie wurden Kodak X-Omat AR-Filme oder Definix-Filme verwendet.

Die zwei-dimensionale Gelelektrophorese wurde nach der Methode von O'Farrell (1975) durchgeführt. Die Röhrchen-Gele für die erste Dimension wurden mit 9,2 M Harnstoff, 2% NP40, 2% Ampholine (pH 3,5-10), 4% Acrylamid/Bisacrylamid (1 : 18) gegossen. Nach dem Lauf (6000 Volt x Stunden) wurden die Gele entweder bei -70°C aufbewahrt oder sofort für 15 Minuten in Äquilibrierungspuffer gelegt. Die äquilibrierten Röhrchen-Gele wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel (s. o.) gelegt, und der Lauf in der zweiten Dimension wurde gestartet.

13. Nachweis von Glycoproteinen mit ^{125}J -Concanavalin A

Für den Nachweis von Glycoproteinen mit dem Lektin Concanavalin A (Con A) wurde die Methode von Burridge (1978) in modifizierter Form angewandt.

a) Markierung von Con A mit ^{125}J

Die Jodierung wurde in einem Volumen von 100–200 μl in Puffer A durchgeführt. Zunächst wurden Con A (5–20 mg/ml) und D-Mannose (40 mg/ml) pipettiert, anschließend wurden 1–2 mCi ^{125}J zugegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5–10 μl Chloramin T (5 mg/ml in deionisiertem H_2O) gestartet und nach 30 Minuten bei Raumtemperatur durch Zugabe von 10–15 μl Natriummetabisulfit (10 mg/ml) gestoppt. Das jodierte Lektin wurde vom ungebundenen ^{125}J und dem Inhibitor D-Mannose durch Filtration über eine Bio-Gel P-10 Säule getrennt, und das Volumen wurde mit Puffer A auf etwa 50 ml erhöht. Hämoglobin wurde zugegeben (Endkonzentration 1 mg/ml), und der Ansatz wurde geteilt. Zu einem Teil wurden zusätzlich 40 mg/ml D-Mannose gegeben. Dieser Ansatz war für das Kontroll-Gel bestimmt.

b) Imprägnieren von Gelen

Zwei SDS-Polyacrylamid-Gele, auf denen identische Proteinproben elektrophoretisch aufgetrennt worden waren, wurden nach dem Entfärben in Puffer A gelegt und durch mehrfachen Pufferwechsel neutral (pH 7,5) gewaschen. Das zur Kontrolle bestimmte Gel wurde über Nacht in Puffer A mit 20 mg/ml D-Mannose inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Gele mit den frisch hergestellten ^{125}J -Con A Lösungen überschichtet. Nach 6–8stündiger Inkubation wurden die Gele ein bis zwei Tage lang, unter häufigen Wechsel, in Puffer A bzw. Puffer A plus 50 mg/ml D-Glucose (Kontroll-Gel) gewaschen. Die Gele wurden mit der Oberseite nach unten getrocknet und autoradiographiert.

14. Herstellung von monoklonalen Antikörpern

a) Zellkultur

Die aus Balb/c Mäusen gewonnene Myeloma Zelllinie P3X63-Ag8.653 (vom Salk Institut, San Diego, USA) wurde für die Fusion verwendet. Diese Zelllinie hat die Fähigkeit verloren, Immunglobuline zu exprimieren, ist aber für die Bildung einer Antikörper-sezernierenden Hybrid-Zelllinie geeignet

(Kearney et al., 1980). Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit 10% FKS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin gezogen.

b) Immunisierung der Mäuse

Im Alter von 6-10 Wochen wurden Balb/c Mäuse (Jackson Laboratorien, USA) intraperitoneal mit gereinigten Virionen injiziert. Gewöhnlich wurden 100 µg Virusprotein eines Virusstammes oder eine Mischung von AD169 und Towne mit je 50 µg Protein zusammen mit inkomplettem Freund's Adjuvans je Injektion eingespritzt. Nach einer Serie von drei Injektionen über einen Zeitraum von 3-5 Wochen wurden die Mäuse mit einer intravenösen Injektion in die Schwanzvene geboostert. Vier Tage später wurden die Tiere getötet und die Milzen entnommen.

c) Präparation der Maus-Milzzellen

Die Milz wurde nach der Entnahme sofort in 10 ml RPMI Medium mit 20% FKS gelegt und mit sterilen Nadeln in feinste Stückchen zerrissen, bis die rote Farbe aus den Gewebestückchen verschwunden war. Die Suspension wurde mehrmals auf und ab pipettiert und schließlich in ein 50 ml Gewebekulturröhrchen überführt. Mit RPMI Medium wurde die Suspension auf 35 ml aufgefüllt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, damit sich die Gewebereste absetzen konnten. Der Überstand wurde als Einzellsuspension verwendet. Die Milzzellen wurden für 10 Minuten bei 10 000 rpm zentrifugiert. Durch Zugabe einer 0,83%igen (w/v) Ammoniumchlorid-Lösung (5 ml) und anschließendem Resuspendieren des Sediments wurden die roten Blutzellen lysiert. Nach 10minütiger Inkubation auf Eis wurden 5 ml RPMI Medium ohne FKS zugegeben und die Zellen sedimentiert. Das weiße Zellkonzentrat wurde in 5 ml RPMI Medium plus FKS resuspendiert. Eine Probe der Suspension wurde 1:50 verdünnt, und die Zellen wurden gezählt.

d) Zellfusion

Die Zellfusion wurde in abgeänderter Form nach der von Levy et al. (1978) beschriebenen Methode durchgeführt. Myelomazellen wurden zur Milzzell-

Suspension gegeben, so daß auf 4 Milzzellen eine Myelomazelle kam. Die Zellen wurden zusammen sedimentiert, vorsichtig in 2 ml 35% Polyäthylenglycol (MW 100, pH 7,9) in RPMI Medium (ohne Serum) resuspendiert und sofort bei Raumtemperatur abzentrifugiert (1500 rpm, 500 g, 6 Minuten). Das Polyäthylenglycol wurde durch Zugabe von 5 ml RPMI (ohne Serum) und sofortiger Zentrifugation (1000 rpm, 260 g, 6 Minuten) ausverdünnt. Der Überstand wurde verworfen, und die fusionierten Zellen wurden in 50 ml RPMI 1640 Medium mit 20% FKS und 10% NCTC 109 Medium resuspendiert. Zusätzlich wurden Milzzellen von einer nicht immunisierten Balb/c Maus zu den fusionierten Zellen gegeben. Die Zellsuspension wurde in eine 150 cm² Gewebekulturflasche überführt und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

e) HAT-Selektion der Hybridzellen und Testen auf positive Klone

Am folgenden Tag wurden Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin zu einer Endkonzentration von 10^{-4} M, 4×10^{-7} M bzw. $1,6 \times 10^{-5}$ M zur Zellsuspension gegeben und die Zellen auf Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen) verteilt. Ungefähr zwei Wochen später wurden die ersten Mediumproben aus den Vertiefungen mit gut wachsenden Hybridzellen entnommen und über einen Radioimmunistest (s. u.) auf Antikörper-Produktion untersucht. Positive Hybridomaklone wurden auf Mikrotiterplatten mit 24 Vertiefungen überführt und in HT-Medium ohne Aminopterin weitergezogen. Die Klone wurden wiederholt auf Sekretion von monoklonalen Antikörpern untersucht. Klone, welche positiv blieben, wurden aufgezogen und in RPMI 1640 Medium mit 10% FKS und Antibiotika gehalten. Ungefähr drei Monate nach der Fusion wurden Klone, die positiv geblieben waren, über Ausverdünnen in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen subkloniert. Die monoklonalen Antikörper wurden mit Hilfe von Immunpräzipitationen und Western-Blots charakterisiert.

15. Radioimmunistest

Die Hybridoma-Zelllinien wurden über einen Radioimmunistest (Köhler, 1980)

auf Antikörperproduktion untersucht. Dazu wurden gereinigte HCMV Partikel (AD169, Towne oder eine Mischung aus beiden Stämmen) mit PBS auf eine Endkonzentration von 2 µg Virusprotein pro ml verdünnt. Die Proteinkonzentration von Virussuspensionen wurde mit dem käuflich erworbenen "Protein Assay Dye Reagent Concentrate" (Bio-Rad) bestimmt. Nach dem Beschallen für 10 Sekunden wurden 0,05 ml der Viruslösung in jede Vertiefung einer Mikrotiterplatte gegeben. Während der folgenden Inkubation bei Raumtemperatur für 2-4 Stunden hafteten sich die Virusproteine fest an das Plastikmaterial (Polyvinylchlorid) an. Die Vertiefungen wurden dreimal mit PBS gewaschen, und in jede Vertiefung wurden 0,1 ml einer BSA-Lösung (10 mg/ml PBS) pipettiert. Nach 45 Minuten bei Raumtemperatur und Waschen mit PBS wurden 0,05 ml Kulturmedium der Hybridoma-Kulturen in jede Vertiefung pipettiert. Nach erneuter Inkubation (4 Stunden, 20°C) und nach Waschen wurden in jede Vertiefung 0,03 ml einer ¹²⁵J-Protein A Lösung gegeben (etwa 20 000 cpm pro Vertiefung, verdünnt mit BSA-Lösung). Protein A bindet an Antikörper, die von den Hybridomazellen sezerniert worden waren und an virale Proteine gebunden haben. Die Inkubation erfolgte über Nacht für 12-16 Stunden bei 4°C. Am folgenden Tag wurde die mit PBS gewaschene Mikrotiterplatte auf einem Kodak-XAR-5 Film exponiert.

16. Immunfluoreszenz

Immunfluoreszenz-Reaktionen (Lazarides and Weber, 1974) wurden auf infizierten HFF-Monolayern ausgeführt. Die Zellen wuchsen auf Petrischalen und wurden drei Tage nach HCMV-Infektion mit PBS gewaschen und mit 1,5% Formaldehyd in PBS für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gespült und für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 0,1% Triton X-100 in PBS behandelt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 30 Minuten bei 37°C mit Antikörpern inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit Fluorescein-konjugiertem Anti-Maus IgG inkubiert. Nach 30minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen gewaschen, in Elvanol eingebettet und unter dem

Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Sollte nur die Zelloberfläche mit den Antikörpern reagieren, dann wurden die Zellen, nach der mit Formaldehyd erfolgten Fixierung, dreimal mit PBS gewaschen und mit Antiserum inkubiert.

17. Western-Blot Analyse

Menschliche HCMV Antiseren oder monoklonale HCMV Antikörper wurden über ihre Reaktion mit HCMV Proteinen analysiert. Die Proteine waren zuvor mit Hilfe der Western-Blot Technik (Burnette, 1981) auf Nitrozellulose-Filter (NC-Filter) transferiert worden.

Proteine von Zellextrakten oder von Virusreinigungen wurden elektrophoretisch auf SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Wasser gespült und für 20 Minuten in Elektrophorese-Puffer gelegt. Die Proteine in dem Gel wurden dann mit 30 Volt bei 4°C im Verlauf von 14 Stunden auf ein NC-Filter (Millipore, HAHY 000 10 oder Schleicher und Schüll, BA 85) transferiert. Nach dem Transfer wurde das NC-Filter in Blockierungspuffer für zwei Stunden bei 40°C geschüttelt und anschließend für 1,5 Stunden bei 37°C mit Antikörpern inkubiert. Menschliche Seren wurden entsprechend ihres KBR-Titers bis 1:100 mit Blockierungspuffer verdünnt. Monoklonale Antikörper im Kulturmedium wurden 1:1 verdünnt. Das NC-Filter wurde nach Antikörper-Reaktion bei Raumtemperatur mit Tris-Saline gewaschen, dann zweimal mit Tris-Saline plus 0,05% NP40 und ein letztes Mal erneut mit Tris-Saline.

Für das Aufdecken der antigenen Proteinbanden wurden zwei verschiedene Techniken verwendet. Beim Austesten von monoklonalen Antikörpern wurde jodiniertes Protein A benutzt, welches an Antigen-Antikörper Komplexe bindet. Das Waschen der Filter und die Markierung mit ¹²⁵J-Protein A wurde nach der Methode von Burnette (1981) ausgeführt. Die antigenen Proteinbanden wurden anschließend durch Exponieren der NC-Filter auf Kodak XAR-5 Filme sichtbar gemacht.

Bei Verwendung von menschlichen HCMV Antiseren wurden ^{35}S -markierte Proteine von infizierten Zellextrakten oder von gereinigten Virionen auf SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und auf NC-Filter transferiert. Deshalb mußte eine nicht-radioaktive Färbemethode zum Aufdecken der antigenen Proteinbanden verwendet werden. Zu diesem Zweck wurde ein ELISA-Test (Towbin et al., 1979) adaptiert. Nach Inkubation der Filter mit den verdünnten Antiseren und anschließendem Waschen, wurden die Filter für 60 Minuten in Kaninchen-Antiserum gegen menschliches Immunglobulin G (Nordic Immunology, 1:200 verdünnt) geschüttelt. Danach wurden die Filter gewaschen und für zwei Stunden mit Peroxidase-markiertem Antikörper (Nordic Immunology, 1:200 verdünnt), die gegen Kaninchen-Immunglobuline gerichtet waren, inkubiert. Nach einem letzten Waschen, wurde die Farb-reaktion mit O-Dianisidin als Substrat durchgeführt. Dazu wurden die Filter in die Färbelösung gelegt, bis dunkelbraun gefärbte Proteinbanden zu sehen waren. Die Filter wurden kurz in Wasser gespült, getrocknet und autoradiographiert. Durch Auflegen der Autoradiogramme (die alle transferierten Proteine zeigten) auf die NC-Filter, konnten die gefärbten antigenen Proteinbanden auf den Filtern identifiziert werden.

18. Isolierung von RNA

Für die Isolierung von RNA aus HFF wurde die Methode von Liu et al. (1979) in modifizierter Form übernommen. Sehr frühe (immediate early, IE) RNA wurde aus infizierten HFF-Kulturen isoliert, welche etwa 15 Stunden zuvor in Anwesenheit von Cycloheximid (100 $\mu\text{g/ml}$) mit HCMV infiziert worden waren. Späte RNA wurde aus infizierten Kulturen 4-6 Tage nach Infektion isoliert, und RNA aus nicht-infizierten HFF (mock-RNA) wurde 2-3 Tage nach dem Passagieren der Zellen geerntet. Die Zellen wurden zweimal mit PBS (ohne Ca^{++} , Mg^{++}) gewaschen, aus den Kulturflaschen durch Abschaben gelöst, 5 Minuten bei 1500 rpm sedimentiert und ein weiteres Mal gewaschen. Diese ersten Schritte wurden bei 0° - 4°C ausgeführt. Das Zellsediment (10^9 - 5×10^9

Zellen) wurde in 7 ml Guanidinium-Hydrochlorid-Puffer lysiert und auf ein CsCl-Kissen (4 ml, 5,7 M) geschichtet. Nach Zentrifugation in einem Spinco SW41 Rotor für 20-24 Stunden bei 28000 rpm und 22°C wurde der Überstand sorgfältig entfernt und das RNA-Sediment in 1-2 ml TES-Puffer resuspendiert. Die RNA wurde mit $\frac{1}{10}$ Volumen 2 M NaCl und dem 2,5fachen Volumen Äthanol gefällt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation im SS34 Rotor (Sorvall) für eine Stunde bei 10 000 rpm und -10°C konzentriert, mit 70% Äthanol gewaschen und anschließend für eine Stunde bei 37°C mit Proteinase K (0,5-1 ml Proteinase K-Extraktionslösung) behandelt. Die RNA wurde zweimal mit Phenol-Chisam (25:25), zweimal mit Chisam und viermal mit Äther extrahiert, mit Äthanol präzipitiert und in autoklaviertem H₂O bei -20°C aufbewahrt.

Polyadenylierte und nicht-polyadenylierte RNA (poly(A)⁺ RNA, poly(A)⁻ RNA) wurden über Oligo(dT) Cellulose-Chromatographie getrennt (Gilham, 1964). Dabei wurde nach der Methode von Aviv und Leder (1972) und nach Angaben der Lieferfirma verfahren. Für sämtliche Arbeiten mit RNA wurden autoklavierte Lösungen und Gefäße verwendet. Nicht autoklavierbare Utensilien wurden mit 15% H₂O₂ oder mit 0,01% Diäthylpyrocarbonat plus 2 µg/ml Polyvinylsulfat vorbehandelt.

19. Fraktionierung von RNA im Saccharosegradienten

Polyadenylierte RNA wurde nach der Größe im Saccharose-Formamid-Gradienten fraktioniert (Siddell et al., 1980). Eine Probe von poly(A)⁺ RNA (50 µg) wurde in 60% deionisiertem Formamid, 1 mM EDTA und 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 für 5 Minuten bei 37°C denaturiert. Nach Zugabe vom 0.5 fachen Volumen an AGB-Puffer wurde die Suspension auf einen 5% bis 20% (w/w) Saccharosegradienten in AGB-Puffer mit 50% deionisiertem Formamid geschichtet. Der Gradient wurde im Spinco SW41 Rotor für 20 Stunden bei 28 000 rpm und 20°C zentrifugiert. Parallel dazu wurden Gradienten gefahren mit nicht-polyadenylierter RNA aus Extrakten infizierter Zellen, ¹⁴C-markierter Escherichia coli RNA (23S, 3,1 Kb; 16S, 1,5 Kb) und ¹⁴C-

markierter RNA aus Eulenaffen-Nierenzellen (28S, 5,2 Kb; 18S, 2,0 Kb). Letztere war von Dr. W. Bodemer zur Verfügung gestellt worden. Die Gradienten wurden vom Boden her zu Fraktionen mit etwa 370 µl ausgetropft. Von den Fraktionen der Marker-Gradienten wurden die Radioaktivität oder die optische Dichte (260 nm) und der RI bestimmt. Die poly(A)⁺ RNA in den einzelnen Fraktionen wurde mit Äthanol präzipitiert und in zwei Proben aufgeteilt, wovon jeweils eine Probe über Northern-Blot Hybridisierung und die andere über in vitro-Translation analysiert wurde.

20. Gelelektrophorese von RNA und Northern-Blot Hybridisierung

Die RNA wurde in MOPS-Puffer aufgenommen, für 15 Minuten bei 65°C in 1 M Glyoxal (McMaster and Carmichael, 1977) denaturiert und auf einem 1% Agarose-Gel, das 2,2 M Formaldehyd und Elektrophorese-Puffer (MOPS-Puffer) enthielt, für 18-20 Stunden bei 40 Volt aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 60 Minuten in 0,05 N NaOH gelegt, zweimal mit Aqua dest. gewaschen und anschließend für 30 Minuten mit 0,5 M Tris-HCl, pH 6,5 neutralisiert. Die RNA wurde mit 20 x SSC auf Nitrozellulose-Filter transferiert (Northern-Blot) nach der Methode von Thomas (1980). Durch Erhitzen der Filter auf 80°C für 5 Stunden wurde die RNA fixiert. Als Vorbereitung für die Hybridisierung wurden die RNA-Blots in 5 x SSC, 5 x Denhardt's Lösung (Denhardt, 1966) und 100 µg/ml Hefe-RNA für 4-6 Stunden bei 65°C vorinkubiert. Anschließend wurde mit ³²P-markierter DNA in Hybridisierungslösung für zwei bis drei Tage bei 46°C hybridisiert. Pro cm² Filterfläche wurde mit 2-5 x 10⁵ cpm in einem Volumen von 0,150 ml/cm² hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurden die Filter bei 65°C gewaschen, viermal für je 15 Minuten mit Waschpuffer (20 mM Natriumphosphat, 0,1% SDS) und 2 x SSC, viermal mit Waschpuffer und 1 x SSC und dreimal für je 20 Minuten mit Waschpuffer und 0,1 x SSC. Nach dem Trocknen wurden die Filter auf Kodak X-Omat AR Filmen exponiert.

21. In vitro Translation von RNA

Translation von mRNA wurde in vitro mit einem käuflich erworbenen Kaninchen-Retikulozyten-Lysat und mit ^{35}S -Methionin als radioaktive Aminosäure durchgeführt (Pelham and Jackson, 1976). Die Reaktionsmischung bestand aus 62,5% (v/v) Retikulozyten-Lysat, 2 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ Endkonzentration ^{35}S -Methionin und 0,06-0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ isolierter RNA aus infizierten oder nicht-infizierten HFF-Kulturen. Ein Ansatz ohne Zugabe von RNA wurde jeweils mitgeführt. Die Kalium- und Magnesium-Konzentration wurde auf 94 mM bzw. 1,4 mM eingestellt. Nach der Inkubation bei 30°C für 80 Minuten wurden die translatierten Proben unmittelbar oder erst im Anschluß an eine Immunpräzipitation gelelektrophoretisch analysiert.

22. Hybrid-Selektion viraler RNA

Die Methode der Hybrid-Selektion von RNA (Ricciardi et al., 1979; Cooper et al., 1981) wurde nach Vorschlägen von H. Esche (Köln, Institut für Genetik) verändert. Je nach Größe des Ansatzes wurden 20-60 μg klonierte virale DNA in 20 mM Tris-HCl, pH 8,5 beschallt, für 10 Minuten auf 95°C erhitzt und sofort in flüssigen Stickstoff gefroren. Nach dem Auftauen wurden die DNA-Lösungen auf Eis gehalten und in 30minütigen Abständen auf Nitrozellulose-Filter getropft. Die Filter (Schleicher und Schüll, BA 85) waren zuvor in 2 x SSC gekocht und in 0,16 cm^2 große Quadrate geschnitten worden. Hitzedenaturierte poly(A)⁺ RNA (0,15-0,2 mg/ml) wurde in 20 mM PIPES, pH 6,5, 0,2% SDS, 50% Formamid, 3 x SSC und 0,1 mg/ml Kalbsleber-tRNA für 4 Stunden bei 56°C mit mehreren Filtern inkubiert. Nicht gebundene RNA wurde entfernt durch fünfmaliges Waschen der Filter in 0,1 x SSC, 0,5% SDS bei 56°C und zweimaliges Waschen in 2 mM EDTA, pH 7,0 bei Raumtemperatur. Spezifisch gebundene RNA wurde mit 0,3 ml H₂O bei 95°C für drei Minuten und anschließendem Kochen für eine Minute von den Filtern gelöst. Zum Eluat wurden 10 μg Kalbsleber-tRNA gegeben, gefolgt von $1/10$ Volumen 2 M Kaliumacetat und 2,5fachen Volumen Äthanol. Nach Lagerung über Nacht bei -20°C wurde die präzipitierte RNA sedimen-

tiert, einmal mit 70% Äthanol gewaschen, getrocknet und in der in vitro-Translation eingesetzt.

23. Isolierung von rekombinanter Plasmid- und Cosmid-DNA

Zur Präparation von viraler DNA, kloniert in Plasmid- und Cosmid-Vektoren, wurden 250 ml Bakterienkulturen angezogen und durch Zentrifugation bei 4000 g für 15 Minuten geerntet. Das Sediment wurde in 30 ml STET-Lysispuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 2 ml Lysozymlösung wurde die Suspension zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, dann 30 Sekunden gekocht und sofort auf Eis gestellt. Die gallertartige Suspension wurde auf zwei Corex-Zentrifugengläser verteilt, im Sorvall SS34 Rotor für 45 Minuten bei 12 000 rpm und 20°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde 1:1 mit Isopropanol gemischt, die DNA bei -20°C präzipitiert und nach 30 Minuten im SS34 für 15 Minuten bei 10 000 rpm und 0°C sedimentiert. Ein DNA-Sediment wurde in 9 ml Tris-Sarkosyl gelöst und die Suspension mit CsCl auf einen RI von 1,3886 eingestellt. Nach Zugabe von 0,5 ml Ethidiumbromid (10 mg/ml H₂O) wurde im 50 ti Rotor für 60 Stunden bei 30 000 rpm und 20°C ins Gleichgewicht zentrifugiert. Die Plasmidbande wurde mit einer Kanüle (1,2 x 50 mm) ausgetropft und das Ethidiumbromid mit Isopropanol (1:1) ausgeschüttelt. Nach Dialyse gegen 20 mM Tris-HCl, pH 8,5 wurde die DNA im Spektralphotometer (220-320 nm) vermessen, mit Äthanol präzipitiert und in 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 bei -20°C aufbewahrt. Die isolierte Plasmid- oder Cosmid-DNA wurde nach Verdauung mit Restriktionsendonukleasen über Gelelektrophorese und anschließender Southern-Blot Hybridisierung überprüft.

24. Subklonierung von viraler DNA in Plasmid-Vektoren

In den Cosmid-Vektor pHC79 (Hohn and Collins, 1980) klonierte DNA-Fragmente des HCMV-Genoms (Fleckenstein et al., 1982) wurden in den Plasmid-Vektor pACYC184 (Chang and Cohen, 1978) subkloniert. Die Vektor-DNA wur-

de mit HindIII gespalten und mit 50 Einheiten/ μ g DNA alkalischer Phosphatase im T4-DNA-Polymerase-Puffer für 30 Minuten bei 65°C inkubiert. Die DNA wurde mit Phenol extrahiert und mit Äthanol präzipitiert. Die Vektor-DNA wurde mit einer entsprechenden Menge an gespaltenen klonierter Virus-DNA ligiert. Die Ligation erfolgte in 100 μ l Ligationspuffer für 16 Stunden bei 4°C. Eine Menge von 0,1 ml des Ligationsansatzes (vorher mit TCM-Puffer auf 1-5 μ g DNA/ml eingestellt) wurden mit 0,1 ml kompetenten E. coli HB101 (s. III.25) gemischt, für 40 Minuten auf Eis und anschließend zwei Minuten bei 42°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium und Inkubation bei 37°C für 30 Minuten, wurden die Zellen auf LB-Agarplatten (mit geeignetem Antibiotikum) ausgestrichen. Über ein weiteres Antibiotikum, für welches die Resistenz nach Insertion viraler DNA verloren geht, wurde auf einfach-resistente Zellen selektioniert. Diese wurden in kleinen Volumina (10-50 ml) angezogen. Die DNA wurde über die schnelle Kochmethode (Holmes and Quigley, 1981) isoliert und über Southern-Blot Hybridisierung und gelelektrophoretischer Auftrennung nach Spaltung mit Restriktionsenzymen identifiziert. Die DNA-Spaltungen mit bakteriellen Restriktionsendonukleasen (Roberts, 1982) erfolgten für zwei Stunden bei 37°C in den vom Hersteller angegebenen Puffern.

25. Klonierung von viraler DNA in den Bakteriophagen M13

Zur Klonierung von DNA in den Bakteriophagen M13 wurde im wesentlichen die Methode von Messing (1981) verwendet.

a) Gelelektion von viraler DNA

Cosmid-Vektoren, die klonierte virale DNA enthielten (Fleckenstein et al., 1982), wurden mit HindIII gespalten und auf einem 1,2% Agarose-Gel (low melting agarose) im Kaltraum für 12 Stunden bei 60 Volt aufgetrennt. Ein kleines Agarosestückchen, welches das gewünschte virale DNA-Fragment enthielt, wurde ausgeschnitten und in 1 ml H₂O für 10 Minuten auf Eis gestellt. Das Wasser wurde dekantiert und das Gel in 0,5 ml TE-

Puffer (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5) für 15 Minuten bei 68°C geschmolzen. Anschließend wurde zweimal mit Phenol und einmal mit Chisam extrahiert. Die in der oberen wässrigen Phase enthaltene DNA wurde durch Zugabe von $\frac{1}{10}$ Volumen 3 M Natriumacetat und das 2,5fache Volumen an Äthanol bei -20°C gefällt. Die DNA wurde sedimentiert, mit 70% Äthanol gewaschen, getrocknet und in 20 μ l TE-Puffer resuspendiert. Vor der Ligation wurde die DNA im Agarose-Gel überprüft.

b) Ligation und Transformation

Im Ligationsansatz wurde die isolierte virale DNA mit der doppelten Menge an dephosphorylierter, HindIII gespaltener MP9 Vektor-DNA (replikative Form, RF) und 1 μ l Ligase (50 U/ml) für 20 Stunden bei 14°C inkubiert. Für die Transformation wurden kompetente Escherichia coli JM103 verwendet. Die Bakterien wurden in YT-Medium bis zu einer Dichte von 0,6-0,7 (OD_{660}) gezogen. Die Zellen wurden im Sorvall SS34 Rotor bei 6000 rpm für 5 Minuten sedimentiert, anschließend in 50 mM $CaCl_2$ (halbes Ausgangsvolumen) resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis gehalten. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und in $\frac{1}{10}$ Ausgangsvolumen an 50 mM $CaCl_2$ resuspendiert. Kompetente JM103 (300 μ l) wurden mit 2 μ l oder 10 μ l vom Ligationsansatz oder mit 1 μ l MP9 RF (Kontrolle) gemischt und 40 Minuten auf Eis gehalten. Die Suspension wurde für zwei Minuten auf 42°C erhitzt. Dann wurden 0,01 ml IPTG (100 mM), 0,05 ml Xgal (2% in Dimethylformamid), 0,2 ml frische exponentiell wachsende JM103 und 3 ml Weichagar (soft agar) zugegeben. Diese Mischung wurde sofort auf YT-Agarplatten ausplattiert. Nach dem Festwerden des Agars wurden die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert.

c) Reinigung von Plaques

Am folgenden Tag wurde auf weiße Plaques selektioniert. Der Phage M13MP9 komplementiert die genetische Information für die in JM103 defekte β -Galaktosidase. Diese Fähigkeit geht jedoch durch eine Insertion verloren, und blaue Plaques werden zu farblosen Plaques. Die Transformationseffi-

zienz betrug 50%. Einzelne Plaques wurden in 1 ml von zweifach konzentriertem YT-Medium überführt und 10^{-6} fach verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 0,2 ml zusammen mit IPTG, Xgal, JM103 und Weichagar ausplattiert, wie in Absatz b) beschrieben.

d) Aufziehen von Phagen

Einzelne Plaques wurden in je 2 ml YT-Medium transferiert und mit 0,1 ml exponentiell wachsenden JM103 für 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Bakterien (mit der replikativen Form des Phagen) wurden sedimentiert. Der Überstand mit den einzelsträngigen (ss) DNA-Phagen wurde 20 Minuten bei 68°C hitzeinaktiviert, um die Bakterien abzutöten und anschließend bei 4°C aufbewahrt.

e) Isolierung von ds und ss Phagen-DNA

Eine Menge von 0,2 ml der Phagensuspension wurde mit 2 ml JM103 für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Dann wurden 0,5 ml YT-Medium und 9 ml JM103 zugegeben und für weitere 6,5 Stunden inkubiert. Die Kultur wurde 20 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert und das Bakteriensediment bei -20°C aufbewahrt für eine spätere Extraktion der ds Phagen-DNA nach der alkalischen Lysismethode (Miller, 1972). Der Überstand wurde mit 37,5 ml 40% PEG 8000 in 5 M NaCl gemischt, für 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und erneut abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 5 ml TE-Puffer mit 0,5% SDS resuspendiert. Dann wurden 5 ml Phenol zugegeben. Es wurde gemischt, abzentrifugiert und ein weiteres Mal mit Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert. Die DNA wurde mit Äthanol gefällt, in TE-Puffer resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

f) C-Test zur Identifizierung der Rekombinanten

Da die Bakteriophagen den Plus-Strang der DNA haben, werden rekombinante Phagen, bei denen in der replikativen Form die klonierte DNA in beiden Orientierungen vorkommt, nur über die inserierte Fremd-DNA hybridisieren. Um zu testen, ob die rekombinanten Phagen die virale DNA in beiden Orien-

tierungen enthielten, wurden je 20 μ l Phagenüberstand mit verschiedenen Rekombinanten gemischt. Es wurden 2 μ l 2% SDS zugegeben, für eine Stunde bei 68°C hybridisiert und die Proben auf einem 1,2% Agarose-Gel aufgetrennt. Hatte eine Hybridisierung über die inserierte DNA stattgefunden (d. h. beide Orientierungen liegen vor), bildeten die DNAs eine 8-ähnliche Struktur und wanderten im Gel langsamer als ihre einzelnen Ringe.

26. Gelelektrophorese von DNA und Southern-Blot Hybridisierung

a) Acrylamid-Gelelektrophorese

Kleine DNA-Fragmente mit 10^3 Basenpaaren oder weniger wurden auf vertikalen 7,5% Acrylamid-Gelen (Bisacrylamid/Acrylamid, 1:30) mit 0,05% Ammoniumperoxodisulfat und 1 μ l/ml TEMED in Elektrophorese-Puffer aufgetrennt. Nach dem Lauf mit 80 Volt für 5 Stunden wurde das Gel mit 1 μ g/ml Ethidiumbromid gefärbt, mit Wasser entfärbt und über UV-Licht fotografiert.

b) Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in horizontalen 0,6-1,2% Agarose-Gelen in TA-Puffer mit 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid. Die DNA-Proben wurden nach Zugabe von 10% Saccharose, 10 mM EDTA und 0,05% Bromphenolblau aufgetragen. Der Lauf fand bei einer Feldstärke von 2 V/cm für 18-20 Stunden und ständiger Pufferumwälzung statt. Anschließend wurde das Gel fotografiert und die DNA auf Nitrozellulose-Filter transferiert (Southern, 1975). Die Filter wurden für 5 Stunden bei 46°C vorhybridisiert in 50% deionisiertem Formamid, 5 x SSC, 5 x Denhardt's Lösung, 50 mM Na-Phosphat, pH 6,5 und 150 μ g/ml Hefe-RNA. Die Hybridisierungslösung enthielt 50% Formamid, 5 x SSC, 1 x Denhardt's Lösung, 20 mM Na-Phosphat, pH 6,5, 100 μ g/ml Hefe-RNA und die 32 P-markierte DNA. Die Hybridisierung war bei 46°C für 18-20 Stunden. Der anschließende Waschvorgang und die Autoradiographie erfolgte wie unter "Northern-Blot Hybridisierung" beschrieben.

27. Radioaktive Markierung von DNA in vitro

Klonierte DNA wurde in vitro nach modifizierter "Nick-repair" Standardmethode (Rigby et al., 1977) mit ^{32}P -CTP markiert. Der Reaktionsansatz enthielt 1-1,5 μg DNA, 0,2 mM dTTP, dATP, dGTP, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 15 mM MgCl_2 , 30-50 ng/ml aktivierte DNase I und 80-100 μCi α - ^{32}P -dCTP. Nach einer Minute bei Raumtemperatur wurden 22 Einheiten DNA-Polymerase I zugegeben und für zwei Stunden bei 14°C inkubiert. Die markierte DNA wurde von den Mononukleotiden durch Chromatographie über Sephadex G 50 abgetrennt. Die Säulen wurden in 5 ml Spritzen gegossen, mit 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 2 mM EDTA gewaschen und einmal in einem 30 ml Corexglas im Sorvall SS34 Rotor bei 2000 rpm und 10°C für zwei Minuten zentrifugiert. Auf die trockene Säule wurde der "Nick-repair"-Ansatz (0,2-0,5 ml) gegeben. Nach Zentrifugation in Plastik-Ampullen bei 2600 rpm für 4 Minuten befand sich die radioaktiv markierte DNA im Durchlauf. Es wurden spezifische Aktivitäten von 4×10^7 bis 1×10^8 cpm/ μg DNA erreicht.

IV. Ergebnisse

A. Charakterisierung der Strukturproteine

1. Übersicht über die Strukturproteine

Proteine des menschlichen Cytomegalovirus (HCMV) wurden von Viruspartikeln, die aus dem Zytoplasma oder dem Kulturüberstand von infizierten Zellkulturen isoliert worden waren, analysiert. Zusätzlich wurden Proteine von Extrakten aus nicht-infizierten Zellen, infizierten Zellen und inkompletten Viruspartikeln miteinander verglichen. Dieser Vergleich von Proteinen aus verschiedenen Isolierungs- und Extraktionsexperimenten erwies sich für die Identifikation der viralen Strukturproteine als notwendig. Denn selbst nach sorgfältiger Reinigung der Viruspartikel über Saccharosegradienten war die Virussuspension mit zellulären und frühen viralen Proteinen kontaminiert und enthielt, neben kompletten Viruspartikeln, gelegentlich "Dense bodies" und defekte Partikel (s. Einleitung). Abbildung 1 zeigt über Saccharosegradienten (15-35%, w/v) gereinigte Viruspartikel aus dem Kulturüberstand von infizierten Zellen (extrazelluläre Virionen). Gereinigte Viruspartikel aus dem Zytoplasma stellten sich im Elektronenmikroskop identisch dar. Zur Analyse ihrer Strukturproteine wurden die Virionen durch Zugabe von ^{35}S -Methionin zu HCMV-infizierten Zellkulturen radioaktiv markiert. Nach Degradation der Partikel wurden die Proteinkomponenten in SDS-Polyacrylamid-Gelen (PAG) elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 2, Spur 3-5). Mit ^{35}S -Methionin markierte Proteine aus HCMV-infizierten Zellen oder nicht-infizierten Zellen wurden vergleichend analysiert (Abb. 2, Spur 1 und 2). Aus diesen Versuchen wurden 25 Proteine mit einem Molekulargewicht von größer als 200 000 bis zu 14 000 als Virionkomponenten von extrazellulär gereinigten Viruspartikeln identifiziert. Abbildung 2 zeigt die Proteine, nachdem sie im SDS-PAG aufgetrennt und ihre Molekulargewichte anhand von Markerproteinen abgeschätzt worden waren. Proteine der Viruspräparationen, die parallel zu zellulären Proteinen der nicht-infizierten Zel-



Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von umhüllten HCMV-Partikeln aus dem Zellkulturüberstand. Der Durchmesser eines Nukleocapsids beträgt etwa 100 nm.

len (Abb. 2, Spur 2) wanderten, wurden nicht als virusspezifisch angesehen. Beispielsweise wurde ein Protein von 44 Kilodalton (Kd), welches in allen Viruspräparationen zu finden war, als zelluläres Protein angesehen. Möglicherweise handelte es sich um zelluläres Aktin. Das wurde über zwei-dimensionale Gelelektrophorese bestätigt, bei der dieses Protein aus dem nicht-infizierten Zellextrakt und der Viruspräparation in gleicher Weise in zwei Proteinflecken aufgetrennt wurde, wie Garrels und Gibson (1976) für Aktin nachgewiesen haben. Drei weitere Proteine von 90 Kd, 74 Kd und 47 Kd wanderten wie zelluläre Proteine (Abb. 2) und konnten nicht eindeutig als virale Strukturproteine identifiziert werden. Mehrere Proteine (120 Kd, 76 Kd, 36 Kd, 34,5 Kd), die charakte-

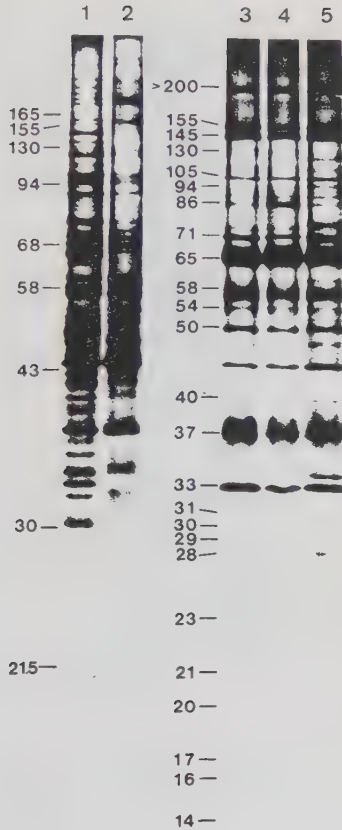


Abb. 2: Autoradiographie von ^{35}S -Methionin markierten Zell- und Virusproteinen nach elektrophoretischer Auftrennung in einem 15% SDS-PAG. (1) Proteine von Extrakten aus Zellen, die mit HCMV Stamm Towne infiziert worden waren. (2) Proteine von Extrakten aus nicht-infizierten Zellen. (3, 4) Proteine von Virionen (Towne), gereinigt aus dem Kulturmedium. (5) Proteine von Virionen (Towne), gereinigt aus dem Zytoplasma. Die Zahlen auf der linken Seite geben die Molekulargewichte ($\times 10^3$) der verwendeten Markerproteine an (RNA-Polymerase, β -Galaktosidase, Phosphorylase b, Rinderserumalbumin, Katalase, Ovalbumin, Carboanhydratase, Trypsininhibitor). Die geschätzten Molekulargewichte ($\times 10^3$) der Virusproteine sind neben Spur 3 angegeben.

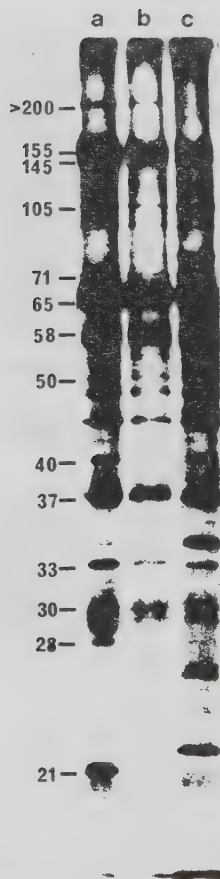


Abb. 3: Autoradiographie von ^{125}J -markierten Strukturproteinen gereinigter HCMV-Partikel. Gereinigte Virionen wurden mit Ultraschall behandelt, die Proteine in vitro mit ^{125}J -Bolton-Hunter-Reagenz markiert und in einem 15% SDS-PAG aufgetrennt. (a) HCMV Stamm AD169 und (b) Towne, gereinigt aus Kulturmedium. (c) Stamm Towne, gereinigt aus Zytoplasma. Die Molekulargewichte ($\times 10^3$) einiger Virusproteine sind angegeben.

ristisch für infizierte Zellextrakte waren (Abb. 2, Spur 1), wurden auch in den zytoplasmatischen Viruspräparationen gefunden (Abb. 2, Spur 5; Abb. 3 c), aber nicht oder deutlich vermindert in den extrazellulären Viruspartikeln (Abb. 2, Spur 3,4; Abb. 3 a,b). Es ist denkbar, daß ge-

reinigtes Virus aus Zytoplasma stärker mit nicht-strukturellen (frühen) Virusproteinen kontaminiert ist oder sich noch im Reifestadium befindet. Das ergibt sich auch daraus, daß die Proteine von 155 Kd, 86 Kd, 54/53 Kd der extrazellulären Viruspartikel in zytoplasmatischen Partikeln in geringeren Mengen vorhanden waren oder manchmal ganz fehlten (Abb. 2; Abb. 3; Abb. 4).

Da die Möglichkeit bestand, daß einige Virusproteine keine oder sehr viele Methioninreste besaßen oder das Proteinprofil unter den Markierungsbedingungen verzerrt werden konnte, wurde eine weitere Methode zur Markierung der Virusproteine benutzt. Gereinigte Viruspartikel wurden mit Ultraschall desintegriert und die Virusproteine unter Verwendung des Bolton-Hunter-Reagenz mit ^{125}J markiert (Bolton and Hunter, 1973; Bolton et al., 1976). Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Virusproteine (Abb. 3) zeigten sich im Vergleich zur ^{35}S -Methionin Markierung nur geringe Unterschiede. Ein Protein von 29 Kd, das nach ^{35}S -Methionin Markierung nie deutlich identifizierbar war, wurde intensiv mit ^{125}J markiert. Zwei Proteine von 86 Kd und 23 Kd wurden dagegen nicht markiert.

Die vollständige Trennung von kompletten Viruspartikeln und "Dense bodies" ist schwierig (Stinski, 1977). Unter Verwendung eines flachen Saccharosegradienten (15-35%, w/v) wanderten Partikel mit viralen antigenen Determinanten durch den Gradienten ins Sediment. Das Proteinmuster dieser Fraktion nach Gelelektrophorese war charakteristisch für "Dense bodies" (Sarav and Abady, 1975; Fiala et al., 1976) (Abb. 4, Spur 2). "Dense bodies" bestehen überwiegend aus einem Polypeptid von 65 Kd. Die wenigen weiteren Proteine wanderten im Gel wie Virionproteine. Da sie in höheren Konzentrationen in Viruspartikeln vorhanden waren, konnten sie nicht als reine Proteine von "Dense bodies" betrachtet werden. Deshalb wurden alle in Tabelle 1 aufgeführten Polypeptide als Strukturproteine des HCMV-Partikels angesehen. Diese 25 Proteine stellen jedoch ein Minimum der möglichen Anzahl an Strukturproteinen dar. Es ist beispielsweise

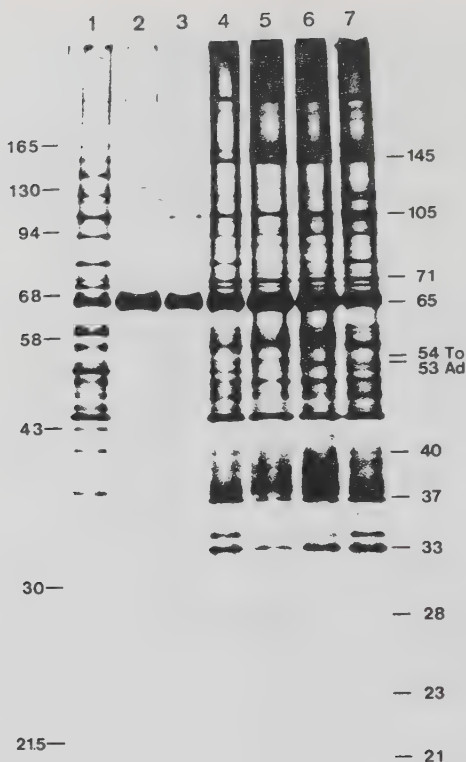


Abb. 4: Autoradiographie von ^{35}S -Methionin markierten viralen Proteinen nach Auftrennung in einem 12,5% SDS-PAG. (1) Proteine von Extrakten aus Zellen, die mit HCMV Stamm Towne infiziert worden waren. (2) Proteine von Towne-Partikeln, isoliert aus Kulturmedium und durch Saccharosegradienten sedimentiert. (3) Proteine von Towne-Partikeln, isoliert aus Zytoplasma und durch Saccharosegradienten sedimentiert. (4) Proteine von Towne-Virionen, isoliert aus Zytoplasma und im Saccharosegradienten gereinigt. (5) Proteine von Towne-Virionen, isoliert aus Kulturmedium und im Saccharosegradienten gereinigt. (6) Proteine von AD169-Virionen, isoliert aus Kulturmedium und im Saccharosegradienten gereinigt. (7) Proteine von AD169-Virionen, isoliert aus Zytoplasma und im Saccharosegradienten gereinigt.

möglich, daß einzelne Proteine auf Grund von Überlagerungen im Gel nicht erkannt wurden. Eine Reihe von feinen Proteinbanden zwischen 155 und 200 Kd, um 105 Kd und im niedermolekularen Bereich waren manchmal, aber nicht reproduzierbar sichtbar. Die Identität dieser Polypeptide als mögliche Strukturproteine konnte darum nicht nachgewiesen werden.

Die bei der Proteinanalyse verwendeten HCMV Stämme Towne und AD169 zeigten bis auf zwei Proteine vollkommene Übereinstimmung im Proteinmuster (Abb. 4, Spur 5 und 6). Das Protein mit einem Molekulargewicht von 54 000 (p54) bei Virusstamm Towne wanderte langsamer als das eventuell entsprechende Protein (p53) von AD169. Das veränderte Wanderungsverhalten im PAG ist erklärbar durch eine unterschiedliche Anzahl der Aminosäuren oder durch einen Aminosäureaustausch mit resultierender Konformationsänderung des Proteins. Die scheinbaren Größenunterschiede des Glycoproteins gp58 der beiden Virusstämme (vgl. IV.A.3 und IV.B.2) kann dagegen auf einen Unterschied in der Zahl der Glycosylreste oder auf eine sterisch veränderte Glycosylbindung zurückzuführen sein.

2. Lokalisation der Proteine im Virion

Die Strukturproteine des menschlichen CMV sollten bezüglich ihrer Lokalisation im Viruspartikel charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurden komplette Viruspartikel mit schwachen Detergenzien behandelt. Durch anschließende Zentrifugation wurden die Nukleocapside sedimentiert und auf diese Weise von den löslichen, außerhalb des Capsids lokalisierten Proteinen, getrennt. Beide Proteinfraktionen wurden auf dem SDS-PAG analysiert und mit parallel aufgetrennten, gesamten Virionproteinen verglichen (Abb. 5).

Einige Proteine (155 Kd, 145 Kd, 86 Kd, 65 Kd, 33 Kd, 28 Kd, 16 Kd, 14 Kd) blieben streng mit den Nukleocapsiden assoziiert (Abb. 5 b; Abb. 6 b). Dagegen schienen andere Proteine, von den Nukleocapsiden überwiegend getrennt zu werden. Diese Proteine (200 Kd, 105 Kd, 94 Kd, 71 Kd, 58 Kd, 50 Kd, 31 Kd, 30 Kd, 21 Kd, 20 Kd, 17 Kd) waren auch in der lös-

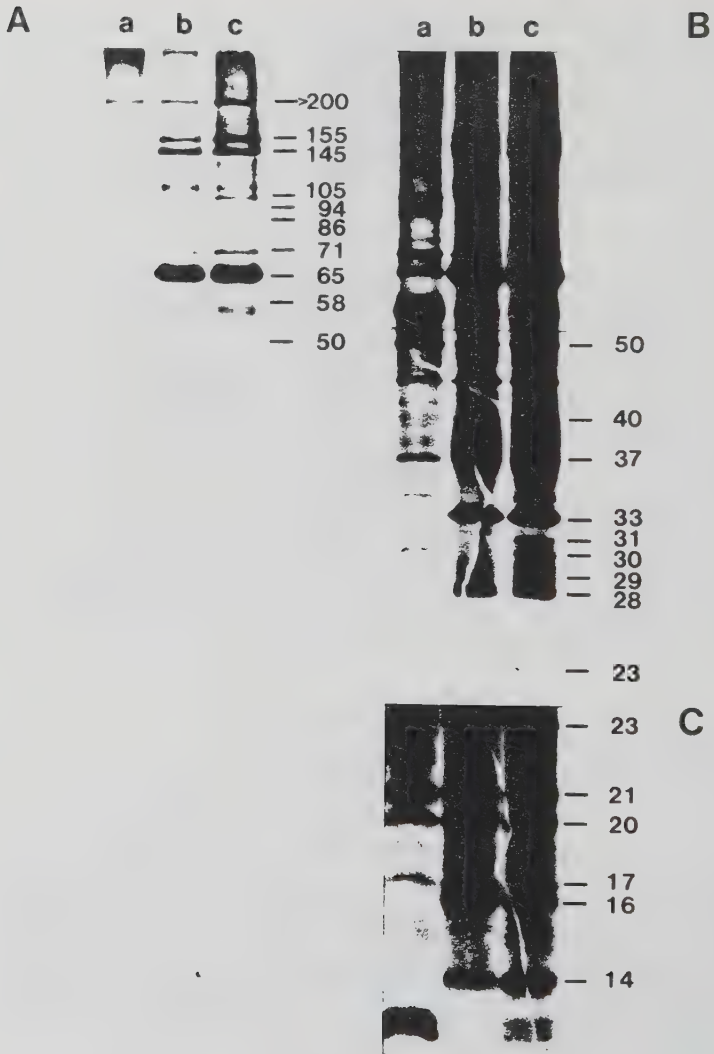


Abb. 5: Auftrennung von (a) löslichen Proteinen, (b) Nukleocapsidproteinen und (c) Strukturproteinen von intakten Viruspartikeln (Stamm Towne) in einem 15% SDS-PAG. Das Gel wurde (A) für 2, (B) für 10 und (C) für 30 Tage exponiert. Die Molekulargewichte ($\times 10^3$) der viralen Proteine sind angegeben.

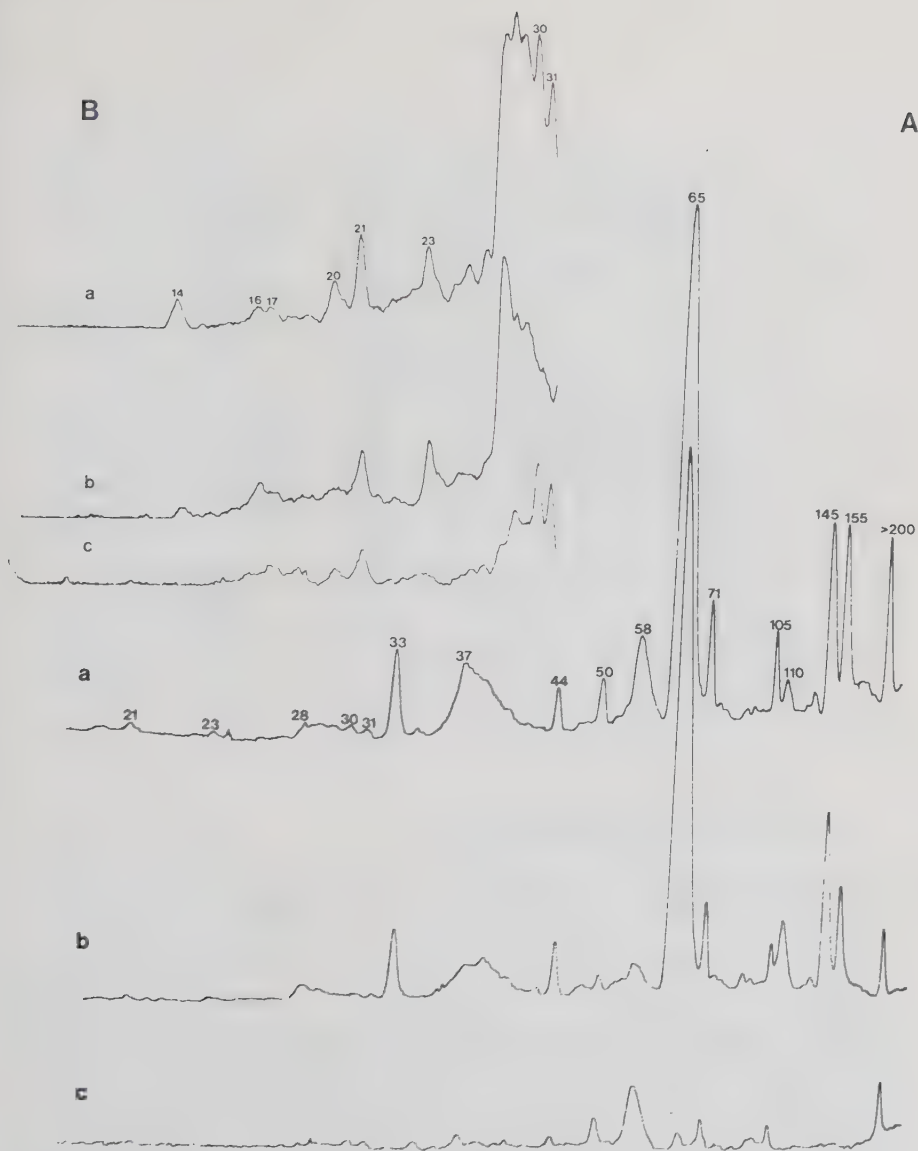


Abb. 6: Densitometrische Auswertung der in Abbildung 5 dargestellten Autoradiographien. (a) ^{35}S -markierte Proteine von intakten Viruspartikeln. (b) ^{35}S -markierte Proteine von Nukleocapsiden. (c) ^{35}S -markierte lösliche Proteine. Die Zahlen geben die Molekulargewichte ($\times 10^3$) der entsprechenden Polypeptide an. (A) Densitometrische Auswertung des 2 Tage exponierten Gels. (B) Auswertung der Proteine < 31 Kd des 10 Tage exponierten Gels.

lichen Proteinfraction zu finden (Abb. 5 a; Abb. 6 c) und sollten deshalb außerhalb des Nukleocapsids lokalisiert liegen. Innerhalb dieser Gruppe gab es einige Proteine (94 Kd, 58 Kd, 50 Kd, 31 Kd, 30 Kd), die durch die Detergenzbehandlung stärker von den Nukleocapsiden gelöst wurden und reine Hüllproteine sein könnten, wohingegen die anderen Proteine Komponenten des Teguments darstellen könnten. Für einige Proteine mit geringer Absorption (130 Kd, 54 Kd, 40 Kd, 37 Kd, 29 Kd) war es nicht möglich, sich auf eine Lokalisation im Viruspartikel festzulegen. Das Polypeptid von 130 Kd, welches eine Gruppe von Glycoproteinen darstellt (s. u.), konnte erst nach Immunpräzipitation mit einem monoklonalen Antikörper als Hüllprotein identifiziert werden (s. IV.B.). Ein Protein von 110 Kd (p110) wurde in der Nukleocapsidfraktion um etwa das Dreifache angereichert (Abb. 6 b). Auf Grund seiner häufigen Abwesenheit in den Präparationen von umhüllten Viruspartikeln wurde p110 nicht als Strukturprotein gezählt. Es könnte als Degradationsprodukt eines höher molekularen Proteins erklärt werden.

3. Identifikation der Glycoproteine

Von viralen Glycoproteinen der Rhabdo-, Toga-, Myxo- und Retroviren ist bekannt, daß die Oligosaccharidketten entweder zum Mannose-reichen Typ gehören, mit Mannose und N-Acetylglucosamin als Glycosylreste, oder zum komplexen Typ. Dieser enthält zusätzlich in den verzweigten Seitenketten N-Acetylglucosamin, Galaktose, Fucose und Neuraminsäure (Etchison et al., 1977; Pesonen and Renkonen, 1976; Burke and Keegstra, 1979; Schwarz et al., 1978; Nakamura and Compans, 1978; Hunt et al., 1979). Die gleichen Kohlehydratreste sind in den virusspezifischen Glycoproteinen des Herpes-simplex Virus gefunden worden (Roizman and Spear, 1971; Honess and Roizman, 1975). N-Acetylglucosamin und Mannose sind also in allen bekannten glycosylierten Virusproteinen wesentliche Bestandteile. Deshalb erfolgte im Rahmen dieser Arbeit der Nachweis der glycosylierten HCMV-Proteine über eine Markierung des replizierenden Virus mit ^3H -Glucosamin und über

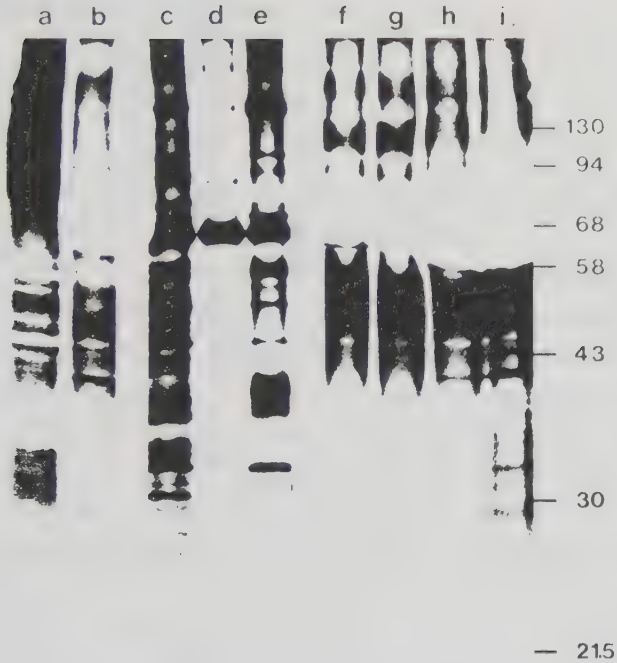


Abb. 7: Autoradiographie von ^{35}S -Methionin bzw. ^3H -Glucosamin markierten Zell- und Virusproteinen (Towne) nach Auftrennung in einem 15% SDS-PAG. (a) ^3H -Glucosamin markierte Proteine von nicht-infizierten Zellen und (b) von HCMV-infizierten Zellen. (c) ^{35}S -Methionin markierte Proteine von HCMV-infizierten Zellen. (d) ^{35}S -markierte Proteine von Towne-Partikeln, isoliert aus Kulturmedium und durch Saccharosegradienten sedimentiert, bzw. (e) im Saccharosegradienten gereinigt. (f) ^3H -Glucosamin markierte Proteine von Towne-Virionen, isoliert aus Kulturmedium, bzw. (g) aus Zytoplasma und im Saccharosegradienten gereinigt. (h) ^3H -Glucosamin markierte Proteine von durch den Saccharosegradienten sedimentierten zytoplasmatischen und (i) extrazellulären Towne-Partikeln. Die Molekulargewichte ($\times 10^3$) der Markerproteine sind angegeben.

eine indirekte Markierung von Mannose-haltigen Glycopeptiden mit ^{125}J -Concanavalin A (Con A). Bei einer weiteren Methode wurden Galaktose- und Neuraminsäurereste über eine Oxidations-Reduktions-Reaktion mit tritiiertem Natriumborhydrid markiert.

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine von gereinigten Viruspartikeln aus ^3H -Glucosamin markierten Kulturen zeigte vier breite Banden im Molekulargewichtsbereich von 155-180 K, 110-135 K, 90-96 K und 40-60 K (Abb. 7 f). Eine Zuordnung zu individuellen Virusproteinen war nicht unmittelbar möglich. In dem Bereich von 155-180 Kd waren keine Virionproteine mit ^{35}S -Methionin oder ^{125}J markiert worden. Die Glycoproteinbande von 90-96 Kd entspricht eventuell der diffus aufgetrennten Proteinbande von 94 Kd (p94) bei einer ^{35}S -Methionin Markierung (Abb. 7 e). Das 65 Kd Polypeptid konnte nicht, wie von anderen Autoren beschrieben (Kim et al., 1976; Stinski, 1977) als Glycoprotein angesehen werden. In den infizierten Zellextrakten und den "Dense body"-Fraktionen erschien zusätzlich ein 15 Kd großes Glycopeptid (Abb. 7 b,h,i). Falls es sich dabei um ein "Dense body"-Protein handelte, so zeigte sein Fehlen in den Viruspräparationen (Abb. 7 f,g), daß diese im wesentlichen frei von "Dense bodies" waren.

In einer zweiten Versuchsserie wurden die Glycoproteine mit Con A markiert. Lektine treten mit einem für sie spezifischen Satz an Kohlehydraten in Wechselwirkung; für Con A sind das, mit abnehmender Bindungsaffinität α -D-Mannopyranose, α -D-Glucopyranose und sterisch verwandte Zucker (Goldstein et al., 1965). Proteine von gereinigten Viruspartikeln oder von Extrakten aus nicht-infizierten Zellen wurden nach Auftrennung im SDS-PAG mit jodiniertem Con A inkubiert und autoradiographisch dargestellt (Abb. 8). Bei den extrazellulären Viruspartikeln stellten sich auch hier vier Gruppen von Glycoproteinen dar, mit etwa den gleichen Molekulargewichten (165 K, 110-135 K, 90-96 K, 55-60 K) wie bei der ^3H -Glucosamin Markierung. Die Glycoproteinbande von etwa 165 Kd war bei den extrazellulären Virionen deutlich schwächer ausge-

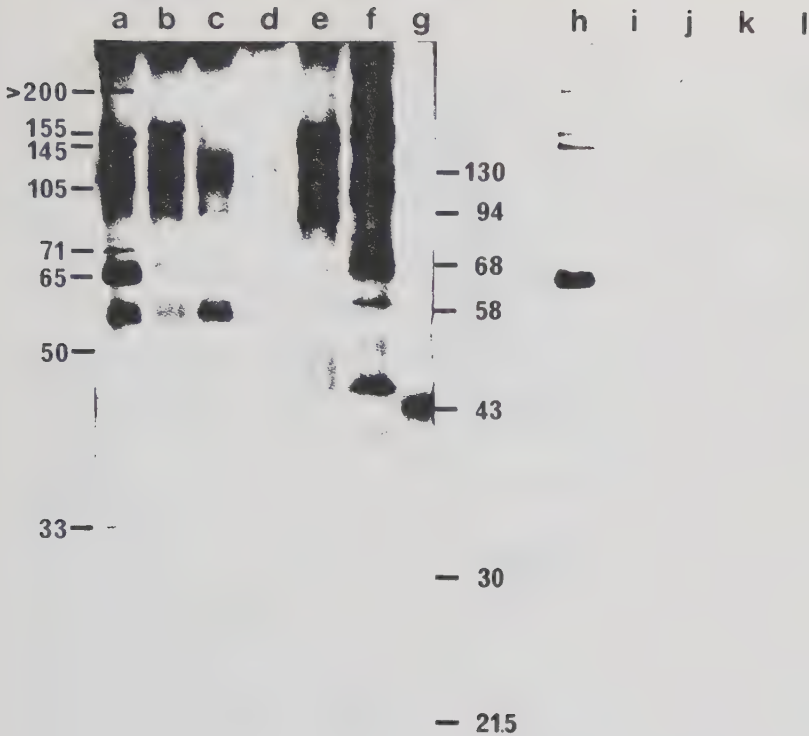


Abb. 8: Autoradiographie von viralen Glycoproteinen nach Auftrennung in einem 15% SDS-PAG und anschließender Markierung mit $^{125}\text{J-Con A}$. Die Proteine in den Spuren a-g wurden mit $^{125}\text{J-Con A}$ markiert, wie in III.13. beschrieben. Bei den Proteinen in den Spuren h-l wurde die Bindung des Lektins an Glycoproteine durch Anwesenheit von Mannose unterbunden. Die Proteine von ^{35}S -markierten Towne-Virionen aus Kulturmedium (a, h), von nicht-markierten Towne-Virionen aus Zytoplasma (b, i), bzw. aus Kulturmedium (c), von nicht-markierten AD169-Virionen aus Kulturmedium (d), bzw. aus Zytoplasma (e, j) und von nicht-markierten, mock-infizierten Zellen wurden im Gel aufgetrennt. In Spur g und l wurden Markerproteine aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit den radioaktiven Con-A Lösungen inkubiert (s. III.13.). Das Markerprotein Ovalbumin, ein Glycoprotein von etwa 43 Kd, wurde spezifisch markiert und diente als Kontrolle.

prägt (Abb. 8 c,d), als bei den Virionen aus Zytoplasma (Abb. 8 b,e). Ein Glycoprotein dieser Größe kam auch in nicht-infizierten Zellen vor (Abb. 8 f). Darum könnte dieses Protein ein im Virion mitgeschlepptes zelluläres Glycoprotein sein oder auch ein virusspezifisches Vorläufer-Glycoprotein mit entsprechender Größe. Die Glycoproteine von 110-135 Kd (gp130) überdeckten eine heterogene Klasse von Polypeptiden, die manchmal als mehrere feine Banden bei ^{35}S -Methionin Markierungen zu sehen waren. Diese Glycoproteine, wie auch gp94 wanderten bei den Virionen aus Zytoplasma etwas schneller. Virionen enthalten jedoch überwiegend nur die höchst glycosylierte Form eines Glycoproteins (Spear, 1980), und die Glycoproteine erreichen dadurch im Gel ein scheinbar größeres Molekulargewicht. Das würde demnach bedeuten, daß die Viruspartikel aus Zytoplasma einer weiteren Modifikation durch Glycosylierung unterliegen und nicht mit den extrazellulären Virionen gleizusetzen sind (s. IV.A.1.). Ein diskret darstellbares Glycoprotein, mit einem Molekulargewicht von 55-60 K (gp58) zeigte eine etwas unterschiedliche Größe bei den Virusstämmen Towne und AD169 und konnte regelmäßig mit einem diffus wandernden ^{35}S -markierten Protein korreliert werden. Die Identität dieses Glycoproteins mit dem ^{35}S -markierten Hüllprotein konnte über die Verwendung eines monoklonalen Antikörpers bewiesen werden (s. IV.B.). Auch die Glycoproteinmarkierung mit Con A bestätigte, daß das dominante Strukturprotein von 65 Kd nicht glycosyliert ist. Allerdings zeigten in diesem Molekulargewichtsbereich die Viruspartikel aus Zytoplasma eine diskrete Glycoproteinbande. Glycosylierte Polypeptide mit einer Größe kleiner als 55 K wurden nicht gefunden. Markierungen mit ^{35}S -Methionin ergaben ein diffus wanderndes Polypeptid von 36-39 Kd, wie es oft von glycosylierten Proteinen gesehen wird. Jedoch gaben weder der ^3H -Glucosamin-Einbau noch die Markierung mit ^{125}I -Con A einen Hinweis auf Glycosylierung dieses Polypeptids.

Die genannten Markierungen sollten alle Glycoproteine erfassen, die Mannose und Glucosamin enthalten. Da es aber sein konnte, daß ungewöhnliche Glycosylierungen vorlagen, wurde eine weitere Methode angewendet,

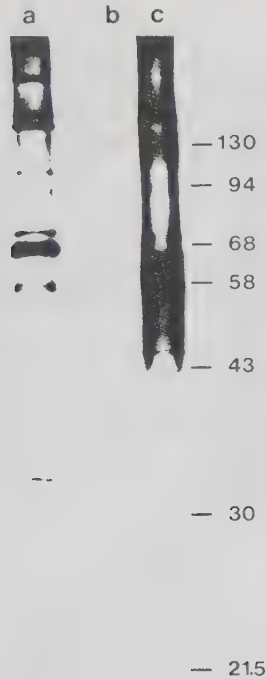


Abb. 9: Autoradiographie von ^{35}S -Methionin und ^3H markierten Virionproteinen. Virionen (Towne) wurden aus dem Kulturmedium von ^{35}S -Methionin markierten oder von nicht-markierten Kulturen gereinigt. Die Proteine der ^{35}S -markierten Virionen wurden in Spur a aufgetrennt. Von den nicht-markierten Virionen wurde 1 Teil mit Neuraminidase und Galaktose-Oxidase inkubiert. Die oxidierten Zuckerreste wurden durch die anschließende Reduktion mit NaB^3H_4 radioaktiv markiert. Spur c zeigt die markierten viralen Glycoproteine. Der 2. Teil der Virionen wurde ohne Zugabe von Enzymen mit NaB^3H_4 inkubiert, um unspezifische Markierungen zu erkennen. Spur b zeigt jedoch, daß ohne enzymatische Behandlung kein radioaktiver Einbau in virale Strukturproteine stattfand.

die auf die Markierung von Galaktose und Neuraminsäure zielte. Gereinigte, extrazelluläre Viruspartikel wurden mit Galaktose-Oxidase und Neuraminidase behandelt und die oxidierten Zuckerreste durch die anschließende Reduktion mit NaB^3H_4 radioaktiv markiert (Abb. 9 c). Doch auch mit dieser Methode wurden keine weiteren Glycoproteine entdeckt, sondern nur die bereits erwähnten Glycoproteine markiert. Das Glycoprotein gp94 ließ sich über NaB^3H_4 kaum markieren und besitzt möglicherweise wenig Galaktose- und Neuraminsäurereste. Bei 68 Kd tauchte eine schwach markierte Bande auf, die bei der Con-A-Markierung nur in den Viruspartikeln aus Zytoplasma gesehen worden war. Drei parallele methodische Ansätze ergaben im wesentlichen übereinstimmende Ergebnisse und führten zu dem Schluß, daß HCMV drei Typen von Glycoproteinen besitzt (gp130, gp94, gp58, Tabelle 1).

4. Identifikation der Phosphoproteine

Über die Markierung von replizierendem Virus mit ^{32}P -Orthophosphat konnten 5 phosphorylierte Strukturproteine identifiziert werden (Abb. 10 d). Die Phosphoproteine mit einem Molekulargewicht von 155 Kd (pp155), 86 Kd (pp86) und 65 Kd (pp65) sind Bestandteile des Nukleocapsids (Tabelle 1). Das Phosphoprotein von 71 Kd (pp71) war sowohl in der löslichen Proteinfraction, als auch in der Nukleocapsidfraktion gefunden worden. Somit unterscheidet sich pp71 von den Glycoproteinen, die sich hauptsächlich bei den löslichen Proteinen befanden. Deshalb konnte angenommen werden, daß pp71 ein inneres Hüllprotein ist. Eine heterogene ^{32}P -Markierung erschien oberhalb von 200 Kd, die keinem speziellen Strukturprotein zugeordnet werden konnte. Extrakte von infizierten Zellen enthielten eine Reihe von weiteren virusspezifischen Phosphoproteinen, die wahrscheinlich frühe virale Genprodukte darstellten (Abb. 10 a). Einige dieser Proteine erschienen schwach sichtbar in Virionen aus Zytoplasma (Abb. 10 c), fehlten jedoch in extrazellulären Virionen. Die gereinigten Viruspartikel aus dem Kulturmedium schienen demnach frei von nicht strukturellen viralen Proteinen zu sein.

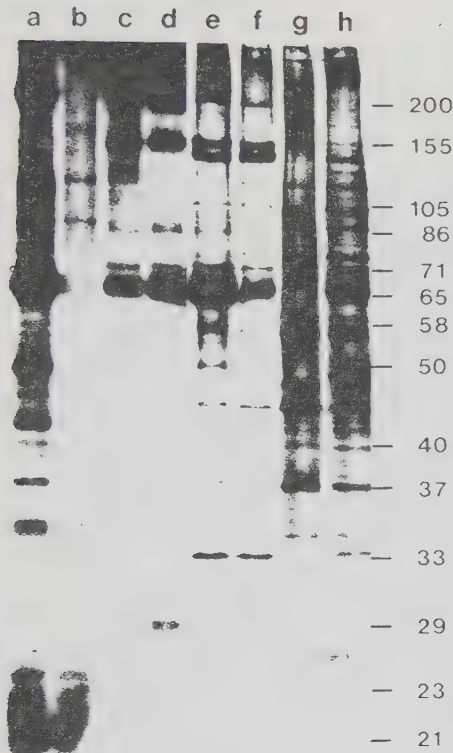


Abb. 10: Autoradiographie von ^{32}P -markierten und ^{35}S -markierten Proteinen nach Auftrennung in einem 15% SDS-PAG. ^{32}P -markierte Proteine von Extrakten aus HCMV-infizierten Zellen (a) oder mock-infizierten Zellen (b). ^{32}P -markierte Proteine von Virionen (Towne), gereinigt aus Zytoplasma (c) oder aus Kulturmedium (d). ^{35}S -markierte Proteine von Virionen (Towne), gereinigt aus Kulturmedium (e) oder aus Zytoplasma (f). ^{35}S -markierte Proteine von Extrakten aus mock-infizierten Zellen (g) oder HCMV-infizierten Zellen (h).

Tabelle 1: Strukturproteine der HCMV-Stämme Towne und AD169

Bezeichnung der Proteine	Molekularge- wicht (x 10 ³)	Modifikation		Immunreaktion		Lokalisation im Virion	
		Glycosy- lierung	Phosphory- lierung	Immunprä- zipitation	Western- Blot	Hülle oder Tegument	Nukleo- capsid
p200	200			+		+	
pp155	155			+	+		+
p145	145		+	+	+/-		+
gp130	110-135			+	+	+	
p105	105	+		+	+	+	
gp94	90-96	+		+	+	+	
pp86	86		+	+	+		+
pp71	71		+	+	+	+	
pp65	64-68		+	+	+		+
gp58	55-60			+	+/-	+	
p54 (p53)	54 (53, AD169)	+		+			
p50	50			+		+	
p40	40			+/-			
p37	36-39			+			
p33	33			+			+
p31	31					+	
p30	30					+	
pp29	29				+		
p28	28		+	+			+
p23	23,5						+
p21	21			+		+	
p20	20,5					+	
p17	17					+	
p16	16						+
p14	14						+

5. Immunogene Eigenschaften der viralen Proteine

Von den in Tabelle 1 aufgeführten viralen Strukturproteinen konnten 16 Proteine mit menschlichen Rekonvaleszentenseren immunpräzipitiert werden (Abb. 11 d,k). Die meisten Proteine im niedermolekularen Bereich und pp86 wurden nicht immungefällt. Dagegen wurde das Polypeptid von 44 Kd, welches wahrscheinlich das zelluläre Aktin darstellt, immunpräzipitiert. Bei der Immunpräzipitation werden häufig im Komplex gebundene Proteine unspezifisch mitgefällt. Da Proteine mit Hilfe von Detergenzien und Ultraschall nicht immer getrennt werden können und außerdem die Struktur der Proteine durch diese Behandlung so verändert werden kann, daß die Antikörper nicht mehr binden, schien es notwendig, eine weitere Methode anzuwenden. Bei der Western-Blot-Technik (Towbin et al., 1979) wurden ³⁵S-markierte Proteine von Extrakten aus nicht-infizierten Zellen, von Extrakten aus HCMV-infizierten Zellen und von gereinigten Virionen in Gelen aufgetrennt, auf Nitrozellulose-Filter übertragen und erst dann einer Immunreaktion mit HCMV-positiven Patientenseren ausgesetzt. Die Autoradiographien der Filter zeigten, daß alle Proteine, bis auf p200 transferiert wurden. Nach der Seruminkubation wurden die Nitrozellulosestreifen, wie unter Absatz III.17. beschrieben, über die Peroxidase-Reaktion angefärbt. Virusproteine, die von Antikörpern erkannt worden waren, erschienen als dunkelbraun gefärbte Banden (Abb. 12). Auffallend war, daß sich das immunogene Proteinmuster von HCMV-infizierten Zellen (Abb. 12 b-d) deutlich von dem gereinigter Virionen unterschied (Abb. 12 g-i). Alle Proteine der gereinigten, extrazellulären Viruspartikel, die kleiner als 50 Kd waren, erwiesen sich als überwiegend nicht immunogen. Lediglich das Phosphoprotein von 29 Kd reagierte stark mit Antikörpern. Die Färbung der Proteine von Extrakten aus infizierten Zellen und die Immunpräzipitation (Abb. 11 f,g) zeigten, daß das menschliche Immunsystem nicht-strukturelle, frühe Proteine oder Vorläufer von Virionproteinen erkennt. Besonders die Phosphoproteine pp49, pp42, pp37, die nur in infizierten Zellen vorkommen (Abb. 10 a) und wahrscheinlich zur

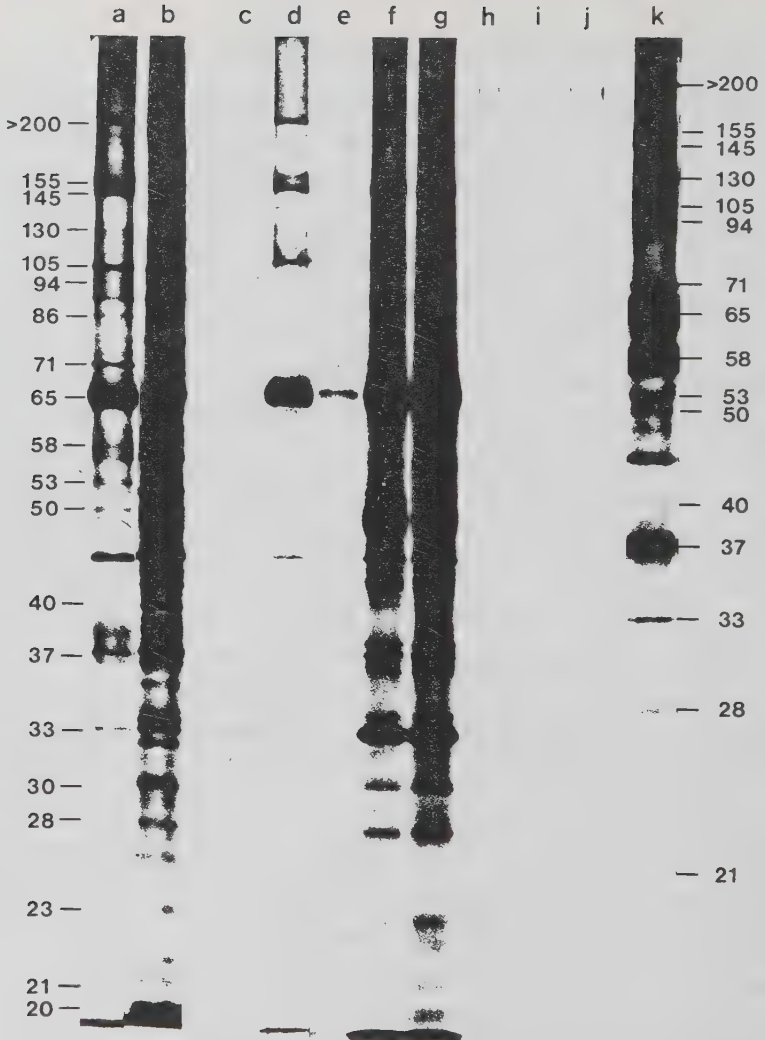


Abb. 11: Autoradiographie von immunpräzipitierten, ^{35}S -markierten Proteinen aus Zellextrakten oder von gereinigten Virionen (AD169). (a) Gesamte Proteine von ^{35}S -markierten Virionen. (b) Gesamte Proteine von Extrakten aus AD169-infizierten und ^{35}S -markierten Zellen. (c) ^{35}S -markierte Proteine von gereinigten, extrazellulären Virionen, nach Immunpräzipitation mit negativem Serum, bzw. (d) mit dem HCMV-positiven Serum AS/TBc. (e) ^{35}S -markierte Proteine von Extrakten aus AD169-infizierten Zellen nach Immun-

Tabelle 2: HCMV-positive Patientenseren^a

Serum	Untersuchungsnr.	Alter des Patienten	Geschlecht	KBR-Titer	α-HCMV IgM
AS/PJ	26 157	38 J	♀	1 : 64	-
AS/IS	25 186	47 J	♀	1 : 128	+
AS/NW	25 688	7 T	♀	1 : 128	+
AS/TBa	16 889	7 J, 3 M		1 : 64	+
" b	20 289	8 J	♂	1 : 128	-
" c	20 696	8 J, 1 M		1 : 256	-

J: Jahre, M: Monat(e), T: Tage

^aDie Patientenseren wurden aus der diagnostischen Abteilung dieses Instituts bezogen.

frühen Phase der viralen Genexpression gehören, erwiesen sich als sehr immunogen. Spezifische Antikörper gegen frühe Genprodukte sind bei Patienten 10-19 Tage nach Beginn einer reaktivierten HCMV-Infektion beobachtet worden (The et al., 1972, 1974, 1977). Abbildung 12 b-d zeigt außerdem, daß sich die Immunreaktion eines Patienten im Laufe der Zeit ändern kann. Das Serum AS/TBa, welches vermutlich zu Beginn der Primärinfektion entnommen worden war (Tabelle 2), hatte gegen einige Proteine noch keine Antikörper. Es enthielt allerdings Antikörper gegen ein Protein von 78 Kd (Abb. 12 d). Dieses Protein (p78) schien spezifisch in

präzipitation mit einem negativen Serum, bzw. (f) mit dem positiven Serum AS/NW oder (g) AS/TBc. (h) ³⁵S-markierte Proteine von Extrakten aus nicht-infizierten Zellen, nach Immunpräzipitation mit einem negativen Serum, bzw. (i) mit dem positiven Serum AS/NW oder (j) AS/TBc. (k) ³⁵S-markierte Proteine von gereinigten Viren, nach Immunpräzipitation mit dem positiven Serum AS/IS. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 12.5% (a-j), bzw. in einem 15% SDS-PAG (k). Nähere Angaben über die verwendeten Seren sind aus Tabelle 2 zu entnehmen.

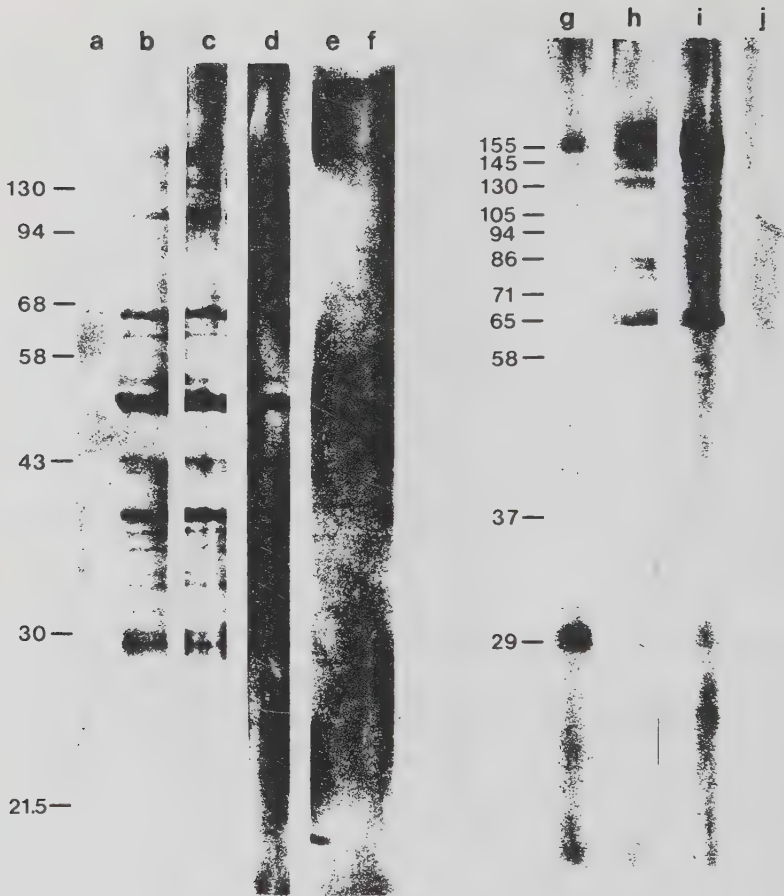


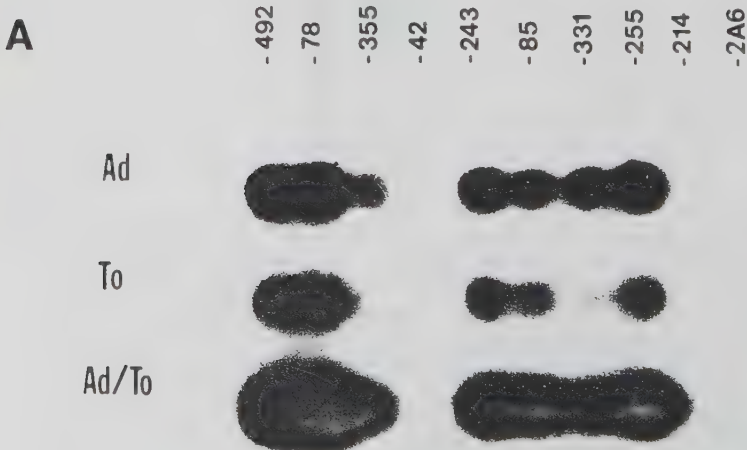
Abb. 12: Darstellung von viralen Proteinen aus Zellextrakten und gereinigten Virionen mit Hilfe der Western-Blot-Technik. Transferierte Proteine von Extrakten aus nicht-infizierten Zellen, nach Reaktion mit dem HCMV-positiven Serum AS/TBc (a) oder mit einem negativen Serum (f). Transferierte Proteine von Extrakten aus Towne-infizierten Zellen, nach Reaktion mit positiven Seren eines Patienten: AS/TBc (b), AS/TBb (c), AS/TBa (d) und nach Reaktion mit einem negativen Serum (e). Transferierte Proteine von Virionen (Towne), nach Reaktion mit positiven Seren von verschiedenen Patienten: AS/TBa (g), AS/PJ (h), AS/IS (i) und nach Reaktion mit einem negativen Serum (j). Nähere Angaben über die verwendeten Seren sind aus Tabelle 2 zu entnehmen.

infizierten Zellen und in Virionen aus Zytoplasma vorzukommen, aber nicht in gereinigten extrazellulären Viruspartikeln (Abb. 2). Nachfolgende Seren des Patienten (AS/TBb und AS/TBc), die zu späteren Zeitpunkten entnommen worden waren, enthielten ein größeres Spektrum von Antikörpern. Allerdings fehlten Antikörper gegen p78 (Abb. 12 c,d).

B. Monoklonale Antikörper gegen Strukturproteine des menschlichen Cytomegalovirus

1. Selektionsverfahren von monoklonalen Antikörpern

Zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern wurden Mäuse mit einer Mischung aus gereinigten Viruspartikeln der HCMV-Stämme AD169 und Towne oder, in einem zweiten Ansatz, nur mit Stamm Towne immunisiert. Den Tieren wurde dreimal in ein- bis zweiwöchigen Abständen HCMV intraperitoneal injiziert. Nach einer letzten Booster-Injektion in die Schwanzvene wurden die Milzzellen präpariert und mit Myelomazellen fusioniert. Die Hybridzellen wurden über Radioimmuntests auf Antikörperproduktion gegen HCMV-Proteine untersucht (Abb. 13). Im ersten Ansatz wurden neun positive Hybridoma-Zelllinien selektioniert. Nach Subklonierung wurden die Zelllinien erneut im Radioimmuntest überprüft (Abb. 13 A). Bei der subklonierten Zelllinie 42 konnte keine Antikörperproduktion mehr nachgewiesen werden. Alle anderen Zelllinien sezernierten Antikörper, die mit Virusproteinen beider Stämme reagierten. Der monoklonale Antikörper 2A6



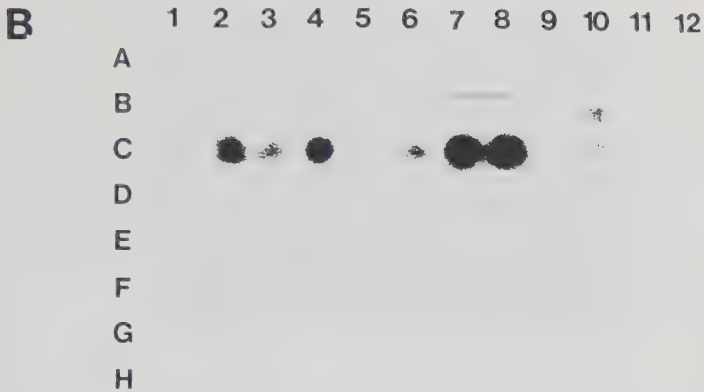


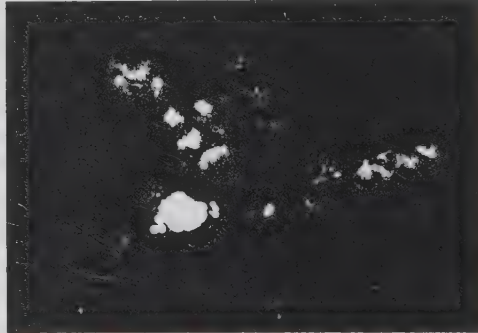
Abb. 13: Radioimmuntests zum Nachweis von monoklonalen Antikörpern gegen HCMV. Gereinigte Viruspartikel von AD169 (Ad), Towne (To) oder von gemischten Stämmen (Ad/To) wurden als Antigen an jede Vertiefung einer Mikrotiterplatte gebunden (Abb. 13 A). Bei dem in Abb. 13 B gezeigten Test wurde nur Stamm Towne gebunden. In jede Vertiefung wurde Kulturüberstand von einer Hybridoma-Zelllinie gegeben. Antigen-Antikörper-Komplexe wurden über die Zugabe von ^{125}J -Protein A mit anschließender Autoradiographie nachgewiesen. Abb. 13 A zeigt den Test mit 9 subklonierten Hybridoma-Zelllinien (492, 78, 355, 42, 243, 85, 331, 225, 214) und einer Zelllinie, die Antikörper gegen ein Adenovirus-Protein produziert (2A6). In dem zweiten Test (Abb. 13 B) wurden die Hybridoma-Zelllinien 3, 31, 108, 127, 128, 142, 150, 157, 211, 244 (C1-C10), 85 (B10) und verschiedene subklonierte Zelllinien von 355 (B9, B11, H10-H12) untersucht. Alle anderen Zelllinien waren negativ (restliche Felder).

wurde als negative Kontrolle eingesetzt. Er war ursprünglich gegen ein Adenovirus-Protein hergestellt worden (Sarnow et al., 1982). Im zweiten Ansatz wurden 10 Hybridoma-Zelllinien etabliert und die Mutterklone vor dem Subklonieren im Radioimmuntest geprüft (Abb. 13 B). Die Zelllinien 3 und 128 waren schwache Produzierer von Antikörpern (Abb. 13 B, C1 und C5).

Monoklonale Antikörper von Hybridoma-Zelllinien der ersten Serie wurden zusätzlich in indirekten Immunfluoreszenztests auf ihre Reaktion mit

HCMV-infizierten Zellen untersucht. Infizierte Zellen wurden nach Fixierung mit monoklonalen Antikörpern inkubiert, gewaschen und mit einem Fluorescein-konjugierten Anti-Maus Antikörper gefärbt. Die Färbung zeigte sich hauptsächlich an der äußeren Zellmembran. Waren die Zellen nach der Fixierung mit Triton X-100 behandelt worden, so wurden auch das Zytoplasma, Einschußkörperchen und manchmal der Zellkern gefärbt (Abb. 14 A und 14 B). Negative Kontrollseren zeigten keine Fluoreszenz der infizierten Zellen (Abb. 14 C).

A



B



C



Abb. 14: Immunfluoreszenz (IF) von HCMV-infizierten Zellen nach Inkubation mit monoklonalen Antikörpern. Infizierte Zellkulturen wurden in Formaldehyd fixiert und mit Triton X-100 behandelt. Anschließend wurden die Zellen in IF-Tests mit monoklonalen Antikörpern gegen virale Strukturproteine inkubiert. Abb. 14 A und 14 B zeigen Immunfluoreszenz nach Verwendung der Antikörper 243 bzw. 492. Als negative Kontrolle wurde der gegen ein Adenovirus-Protein gerichtete Antikörper 2A6 verwendet (Abb. 14 C).

2. Spezifität der monoklonalen Antikörper

In den folgenden Experimenten sollten die Virusproteine, mit denen die monoklonalen Antikörper reagierten, identifiziert werden. Da alle monoklonalen Antikörper mit Hilfe des Radioimmunitests selektioniert worden waren, konnten sie an St. aureus Protein A binden und in Immunpräzipitationen und Western-Blot-Tests eingesetzt werden. Zunächst wurden Immunpräzipitationen mit gereinigten Viruspartikeln durchgeführt, die über Ultraschall degradiert und mit Bolton-Hunter-Reagenz jodiniert worden waren. Diese antigene Mischung, bestehend aus isolierten Proteinen, Proteinaggregaten und noch intakten Viruspartikeln, wurde mit Antikörpern von verschiedenen Hybridomaklonen inkubiert. Der überwiegende Teil der monoklonalen Antikörper aus erster Serie (492, 78, 243, 85, 255, 214) präzipitierte alle HCMV-Virionproteine mit verstärkter Anreicherung des Glycoproteins von 58 Kd (gp58) (Abb. 15). Im Vergleich dazu war gp58 in

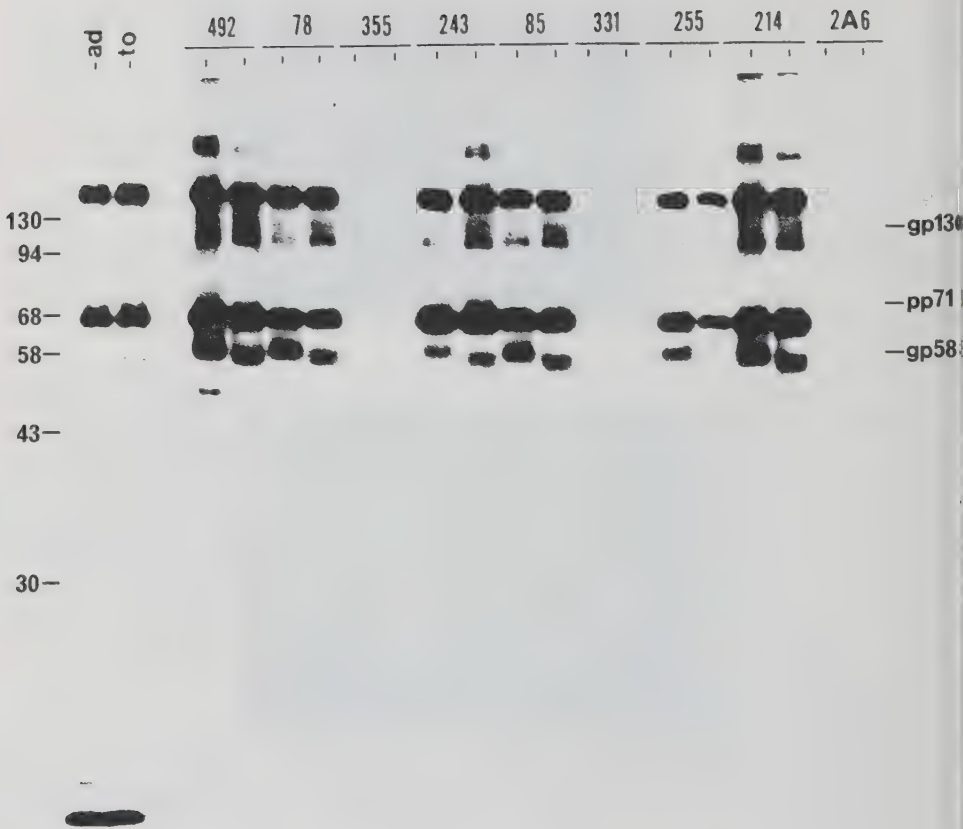


Abb. 15: Immunpräzipitation von ^{125}J -markierten Virionproteinen mit monoklonalen Antikörpern. (ad) Gesamte Proteine von extrazellulären, ^{125}J -markierten AD169-Virionen. (to) Gesamte Proteine von extrazellulären, ^{125}J -markierten Towne-Virionen. Die folgenden Spuren zeigen die Proteine der ^{125}J -markierten und degradierten Viruspartikel nach Immunpräzipitation mit den monoklonalen Antikörpern 492, 78, 355, 243, 85, 331, 225, 214 und 2A6 (negative Kontrolle). Für jeden Antikörper sind die präzipitierten Virusproteine zunächst von AD169 und dann von Towne gezeigt. Die Proteine wurden nach Auftrennung im SDS-PAG autoradiographisch dargestellt. Auf der linken Seite der Autoradiographie sind die Größen ($\times 10^3$) von parallel aufgetrennten Markerproteinen angegeben, auf der rechten Seite die Positionen der Glycoproteine gp130, gp58 und des Phosphoproteins pp71.

den Viruspartikeln deutlich weniger vorhanden, wenn diese ohne Immunpräzipitation analysiert wurden (Abb. 15 ad,to). Da das eingesetzte Antigen aus Viruspartikeln und gelösten Proteinen bestand und gp58 ein Protein der Virushülle ist, könnten gegen gp58 gerichtete Antikörper sowohl mit intakten HCMV-Partikeln, als auch mit dem freien gp58 reagieren und dieses Protein dadurch anreichern. Das Glycoprotein gp58 zeigte bei den Virusstämmen AD169 und Towne ein unterschiedliches Wanderungsverhalten im Gel (vgl. IV.A.3). Die Hybridoma-Zelllinien 355 und 331 produzierten Antikörper, die das Polypeptid pp71 präzipitierten (Abb. 15). Dieses Protein sollte demnach im Innern des Viruspartikels lokalisiert sein, da die Antikörper nur freies pp71 fällen konnten (vgl. IV.A.2).

Um das Antigen der monoklonalen Antikörper 78, 85, 214, 243, 255 und 492 genau zu bestimmen, wurde versucht, die Proteine der Viruspartikel besser zu trennen. Gereinigte Virionen wurden neben der Behandlung mit Ultraschall, für 30 Minuten bei 37°C in Lysispuffer mit SDS und β -Mercaptoöthanol inkubiert und in Immunpräzipitationen eingesetzt. Die monoklonalen Antikörper präzipitierten ein Protein in der Größe von 55 K bis 60 K (bezeichnet als gp58) und eine diffus wandernde Gruppe von Proteinen im Bereich von 130 K (bezeichnet als gp130). Die monoklonalen Antikörper 331 und 355 waren nach Behandlung der Virionen mit starken Detergenzien nicht mehr in der Lage, pp71 oder ein anderes Protein zu fällen.

In einem weiteren Ansatz wurden gereinigte, extrazelluläre und mit ³⁵S-Methionin markierte Viruspartikel mit milden Detergenzien behandelt. Anschließend wurden die gelösten äußeren Virionproteine von den Nukleocapsiden über Zentrifugation getrennt (vgl. IV.A.2). Die Glycoproteine gp58 und gp130 wurden abgetrennt und sedimentierten nicht mit den Nukleocapsiden. Ebenso befand sich ein Teil des pp71 in der löslichen Proteinfraktion. Nach Inkubation der gelösten HCMV-Proteine mit den monoklonalen Antikörpern 492 und 85 wurden auch hier die Pro-

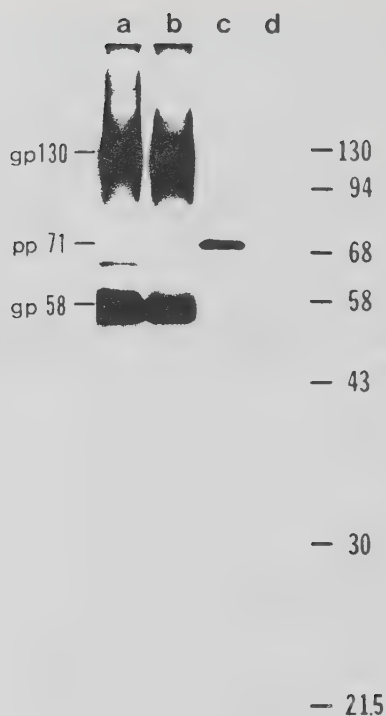


Abb. 16: Immunpräzipitation der gelösten Proteine von ^{35}S -markierten Virionen (Towne) mit monoklonalen Antikörpern. ^{35}S -markierte Virionproteine der löslichen Proteinfraction, nach Immunpräzipitation mit den monoklonalen Antikörpern 492 (a), 85 (b), 355 (c) oder Pab421 (d). Pab421 ist gegen ein zelluläres Protein gerichtet und diente als negative Kontrolle (Gurney et al., 1980). Die präzipitierten Proteine wurden in einem 15% SDS-PAG aufgetrennt und autoradiographisch dargestellt. Die Positionen von gp130, gp58 und pp71 und die Molekulargewichte ($\times 10^3$) der Markerproteine sind angegeben.

teine gp58 und gp130 gefällt (Abb. 16 a,b), und der Antikörper 355 präzipitierte pp71 (Abb. 16 c). Die Präzipitation des dominanten Strukturproteins von HCMV (pp65) mit den monoklonalen Antikörpern erwies sich als unspezifisch, da es auch nach Immunfällung mit negativen Kontrollseren im Gel erschien (Abb. 16 d; Abb. 17 f; Abb 18 a,b). Die Gruppe von Proteinen in dem Bereich um 130 Kd war bei direkter Auftrennung von ^{125}J - oder ^{35}S -markierten Virionproteinen nur schwer im Gel identifizierbar, konnte jedoch nach Immunpräzipitation mit monoklonalen Antikörpern sichtbar angereichert werden.

Um abzuklären, daß die monoklonalen Antikörper 78, 85, 214, 243, 255 und 492 in der Tat mit Glycoproteinen reagierten und nicht mit unmodifizierten Proteinen entsprechender Größe, wurden gezielt die Glycoproteine von HCMV mit ^3H -Glucosamin oder über die NaB^3H_4 -Methode (Markierung von Galaktose- und Neuraminsäureresten) markiert und mit den monoklonalen Antikörpern präzipitiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Proteine und Autoradiographie, wurden ebenfalls die beiden Proteine gp58 und gp130 identifiziert. Manchmal wurde, bei Markierung der Galaktose- und Neuraminsäurereste, ein drittes Glycoprotein oberhalb von 155 Kd präzipitiert (Abb. 17 b-c). Ein Glycoprotein dieser Größe wurde bei Viruspartikeln, die aus dem Zytoplasma gereinigt worden waren, beschrieben (vgl. IV.A.3). Bisher ist offen, ob dieses Glycoprotein auch Bestandteil der extrazellulär gereinigten Viruspartikel ist oder ob es sich um eine Kontamination mit einem viralen Vorläuferprotein handelt, welches über die Immunpräzipitation sichtbar angereichert wird.

Alle monoklonalen Antikörper gegen gp58 präzipitierten gleichzeitig auch gp130. Mehrere Möglichkeiten könnten der Grund für diese Beobachtung sein. Erstens könnte gp58 mit gp130 physisch assoziiert sein. Zweitens könnten die monoklonalen Antikörper mit Oligosaccharidketten reagieren, die bei beiden Proteinen vorkommen könnten. Eine dritte Möglichkeit ist, daß gp58 proteolytisch aus gp130 entstehen könnte

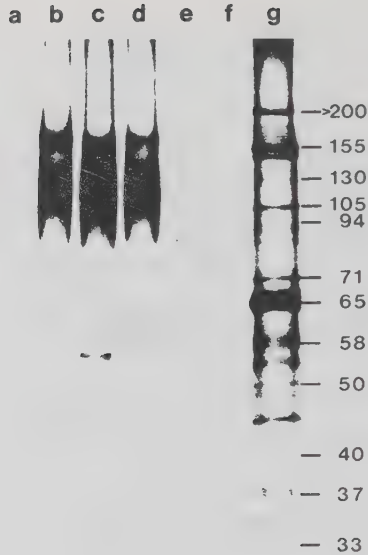


Abb. 17: Immunpräzipitation von ^3H -markierten viralen Glycoproteinen mit monoklonalen Antikörpern. Glycoproteine von gereinigten extrazellulären Viruspartikeln (Towne) wurden über die NaB^3H_4 -Methode markiert und mit den monoklonalen Antikörpern Pab421 (negative Kontrolle) (a), 492 (b), 85 (c) oder 78 (d) präzipitiert. Parallel dazu wurden ^{35}S -markierte Virionproteine mit den monoklonalen Antikörpern 492 (e) oder Pab421 (f) präzipitiert. (g) Gesamte Proteine von ^{35}S -markierten Virionen (Towne). Die Proteine wurden in einem 12,5% SDS-PAG aufgetrennt und autoradiographisch dargestellt. Die Molekulargewichte ($\times 10^3$) einiger Virionproteine sind angegeben.

und viertens, daß die mRNAs dieser Glycoproteine sich in ihren Sequenzen teilweise überlappen. Die Analyse der beiden Glycoproteine in der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC), in Zusammenarbeit mit Carl Anderson (Brookhaven, USA), zeigte, daß gp58 und gp130 gemeinsame

tryptische Peptide besitzen. Somit könnten beide Proteine von einem monoklonalen Antikörper spezifisch erkannt werden.

Bei der weiteren Charakterisierung der monoklonalen Antikörper gegen gp58 und gp130 wurden auch Proteine von infizierten Zellextrakten und von gereinigten Virionen aus Zytoplasma präzipitiert. In beiden Fällen wurde noch ein Protein von 52 Kd gefällt, das kaum oder überhaupt nicht glycosyliert war. Abbildung 18 zeigt, daß dieses 52 Kd Polypeptid aus

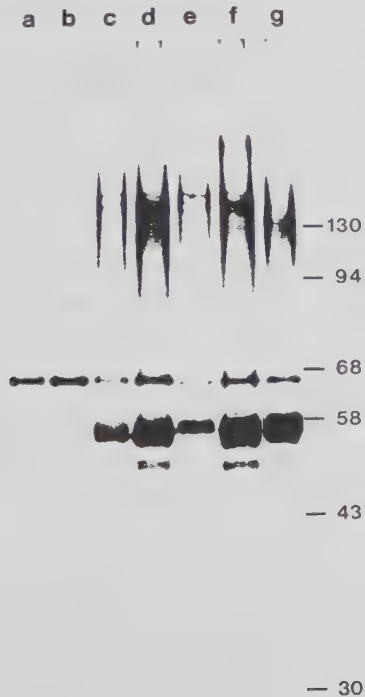


Abb. 18: Immunpräzipitation von ^{35}S -markierten Virionproteinen mit monoklonalen Antikörpern. Proteine von ^{35}S -markierten Virionen (Ad169 a,c,e; Towne b,d,f) aus Zytoplasma, nach Immunpräzipitation mit den monoklonalen Antikörpern Pab421 (a und b), 85 (c und d) oder 492 (e und f). (g) Proteine von ^{35}S -markierten extrazellulären Virionen (Towne), nach Immunpräzipitation mit dem Antikörper 85. Die Auftrennung erfolgte in einem 10% SDS-PAG.

beiden HCMV-Stämmen (AD169 und Towne) bei Reinigung aus dem Zytoplasma präzipitiert wurde (Abb. 18 c-f), aber nicht aus extrazellulär gereinigten Virionen (Abb. 18 g). Es wird vermutet, daß dieses Protein eine Vorläuferform von gp58 darstellt.

Die monoklonalen Antikörper wurden in denaturierenden Proteingelen in ihre schweren und leichten Ketten aufgetrennt, die für jeden Antikörper charakteristische Größen aufwiesen. Beim Antikörper 85 interferierte die schwere Kette mit gp58 und komprimierte das Glycoprotein in 12,5 und 15%igen Gelen zu einer schärferen Bande (Abb. 16 b, Abb. 17 c).

Von den Hybridoma-Zelllinien des zweiten Ansatzes, wurden acht näher charakterisiert. Zwei Zelllinien (31 und 150) produzierten monoklonale Antikörper, die ebenfalls mit gp58 und gp130 reagierten. Gewöhnlich reichten 0,2 ml Kulturmedium einer Hybridoma-Zelllinie bei jeder Immunpräzipitation aus, um den Antikörper im Überschuß zu haben und das Antigen vollständig zu präzipitieren (bei $>0,5 \mu\text{g}$ eingesetztem Protein). In Abbildung 19 wird das für die Antikörper 150 und 31 demonstriert, die bei der ersten Immunpräzipitation gp58 und gp130 vollständig präzipitierten (Abb. 19 b,c) und bei einer zweiten Präzipitation der verbliebenden Antigene, kein gp58 oder gp130 mehr vorfanden (Abb. 19 d,e). Der Antikörper 127 war gegen das phosphorylierte Nukleocapsidprotein von 155 Kd gerichtet (Abb. 19 g; Abb. 20 b). Die monoklonalen Antikörper 108 und 142 präzipitierten aus ^{125}J -markierten Virusproteinen ein 29 Kd großes Polypeptid (Abb. 19 h und i), welches sich nach Immunpräzipitation von ^{32}P -markierten Proteinen, als das Phosphoprotein pp29 identifizieren ließ (Abb. 20 a). Abbildung 20 c zeigt die Immunfällung mit einem gegen pp71 gerichteten monoklonalen Antikörper aus erster Serie. Dabei wurden die Nukleocapsidproteine pp155 und pp65 copräzipitiert (vgl. Abb. 15). Das könnte bedeuten, daß das zum Teil lösliche, aber im Innern des Viruspartikels lokalisierte Strukturprotein pp71 in Kontakt mit dem Nukleocapsid steht.

Die Hybridoma-Zelllinie 128 produzierte wenig Antikörper. Diese präzipitierten die viralen Strukturproteine p200 und p105 (Abb. 21). Das virale

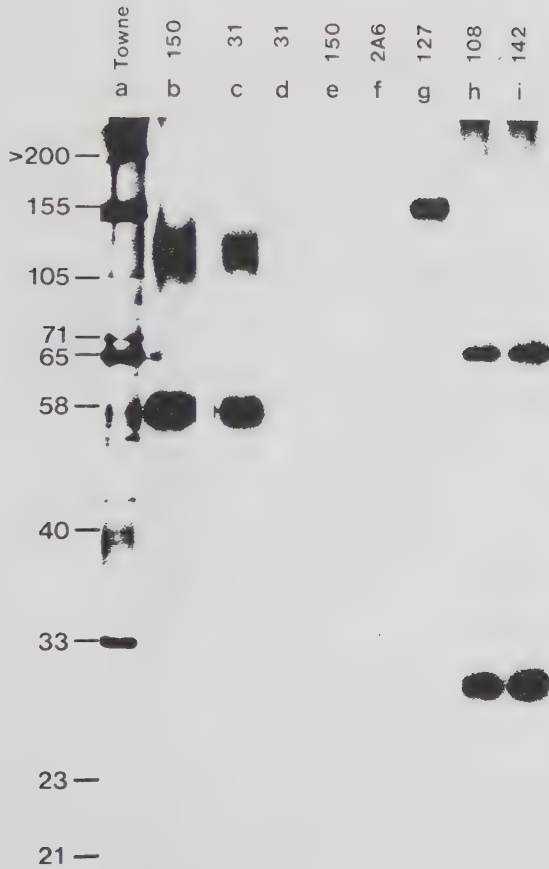


Abb. 19: Immunpräzipitation von ^{125}J -markierten Virionproteinen mit monoklonalen Antikörpern. (a) Gesamte Proteine von gereinigten extrazellulären Viruspartikeln (Towne), die in vitro mit Bolton-Hunter-Reagenz jodiniert worden waren. Vor der Immunpräzipitation wurde die Virussuspension in Lysispuffer mit SDS und B-Mer-captoöthanol inkubiert. Die folgenden Spuren zeigen ^{125}J -markierte Virionproteine, nach Immunpräzipitation mit den monoklonalen Antikörpern 150, 31, 2A6 (negative Kontrolle), 127, 108 und 142. Die Proteine in den Überständen der in Spur b und c gezeigten Immunpräzipitate wurden ein zweites Mal mit den monoklonalen Antikörpern 31 und 150 (Spur d und e) präzipitiert. Die Proteine wurden in einem 15% SDS-PAG aufgetrennt und autoradiographisch dargestellt. Die Molekulargewichte ($\times 10^3$) einiger Virionproteine sind angegeben.

phosphorylierte Polypeptid von 65 Kd kontaminierte auch hier die Proben nach Immunpräzipitation. Zwei monoklonale Antikörper (157 und 244) präzipitierten jedoch mehr von pp65, und es wurde versucht, herauszufinden, wie spezifisch die Reaktion ist. Mit ^{32}P -Orthophosphat mar-

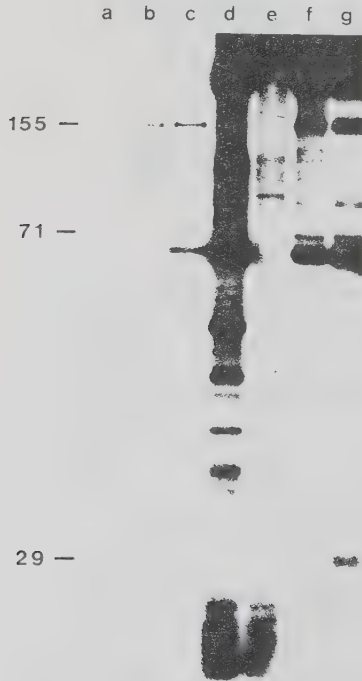


Abb. 20: Immunpräzipitation von ^{32}P -markierten Virionproteinen mit monoklonalen Antikörpern. Proteine von ^{32}P -markierten Virionen (Towne), nach Immunpräzipitation mit den monoklonalen Antikörpern 108 (a), 127 (b) oder 355 (c). (d) Gesamte Proteine von Extrakten aus Towne-infizierten und ^{32}P -markierten Zellen. (e) Gesamte Proteine aus Extrakten von nicht-infizierten, ^{32}P -markierten Zellen. (f) Gesamte Proteine von ^{32}P -markierten Virionen aus Zytoplasma. (g) Gesamte Proteine von ^{32}P -markierten extrazellulären Virionen (vgl. Abb. 10). Die Positionen der Phosphoproteine von 155 Kd, 71 Kd und 29 Kd sind angegeben.

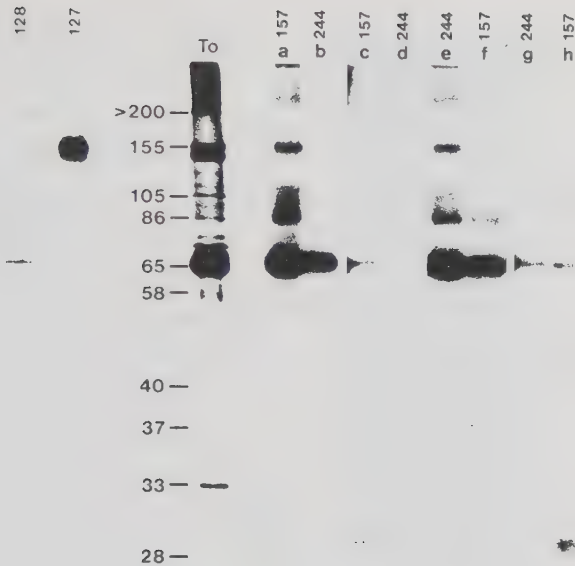


Abb. 21: Immunpräzipitation von ^{125}J - und ^{32}P -markierten Virionproteinen (Towne) mit monoklonalen Antikörpern. (128, 127) Proteine von ^{125}J -markierten extrazellulären Virionen, nach Immunpräzipitation mit den monoklonalen Antikörpern 128 und 127. (To) Gesamte Proteine von ^{35}S -markierten extrazellulären Virionen. In den folgenden Immunpräzipitationen (a-h) wurden ^{32}P -markierte extrazelluläre Virionen eingesetzt. Ein Teil der Viruspartikel wurde in Lysispuffer inkubiert, beschallt und die Proteine wurden mit dem monoklonalen Antikörper 157 präzipitiert (a). Die Immunpräzipitate wurden an *St. aureus* gebunden und sedimentiert, und der Überstand wurde ein zweites Mal mit dem Antikörper 244 inkubiert (b). Die Spuren e und f zeigen diesen Ansatz in umgekehrter Reihenfolge. Der andere Teil der ^{32}P -markierten Virionen wurde zusätzlich mit SDS und β -Mercaptoöthanol behandelt. Die Virionproteine wurden zuerst mit dem Antikörper 157 präzipitiert (c) und dann der Überstand ein zweites Mal mit dem Antikörper 244 (d). Die Spuren g und h zeigen den gleichen Ansatz, jedoch unter Verwendung der Antikörper in umgekehrter Reihenfolge. Die Proteine wurden in einem 15% SDS-PAG aufgetrennt und autoradiographisch dargestellt. Die Molekulargewichte ($\times 10^3$) einiger Virionproteine sind angegeben.

kierte Viruspartikel wurden nach Inkubation in Lysispuffer und Ultraschallbehandlung mit den Antikörpern 157 und 244 inkubiert. Im Präzipitat fanden sich bis auf pp71 alle Phosphoproteine (Abb. 21 a,e), jedoch in anderen Mengenverhältnissen als im Viruspartikel. Das Nukleocapsidprotein pp155 war unterrepräsentiert und wurde wahrscheinlich im Komplex mitgefällt. Antikörper 157 reagierte, im Vergleich zu 244 stärker mit pp29 und reicherte das Protein an (Abb. 21 a,e). Eine hohe Spezifität der monoklonalen Antikörper gegen die Nukleocapsidproteine pp65 und pp86 zeigte sich nicht, denn bei einer zweiten Immunpräzipitation des Ansatzes erschienen diese Proteine wieder im Präzipitat (Abb. 21 b,f). Auch danach waren weiterhin nicht gefälltes pp65 und pp86 in der Antigensuspension zu finden. Wenn die Virionen zusätzlich mit SDS und β -Mercaptoäthanol zerstört wurden, konnte nur noch der monoklonale Antikörper 157 ein Protein (pp29) präzipitieren (Abb. 21 c,d und g,h). Ein entsprechendes Ergebnis wurde mit Western-Blots erhalten. Der Antikörper 244 reagierte mit keinem Protein und 157 reagierte nur mit pp29 (Abb. 22 f). Möglicherweise ist pp29 mit dem Nukleocapsid assoziiert, so daß bei unzureichender Degradation der Viruscapside und Inkubation mit Antikörper 157, Nukleocapsidproteine unspezifisch mitgefällt werden. Dagegen könnte Antikörper 244 gegen eine übergeordnete Proteinstruktur (z. B. Nukleocapsid) gerichtet sein, die bei vollständiger Degradation zum Verlust der Bindungsfähigkeit des Antikörpers führt (Abb. 21 g). Eine zweite Erklärung wäre, daß der Antikörper 244 an ein anderes Epitop bindet als 157 und nach Behandlung mit starken Detergenzien, das denaturierte Protein nicht mehr erkennen kann.

Der monoklonale Antikörper 127 wurde ebenfalls im Western-Blot getestet, da aus den Immunpräzipitationen nicht deutlich hervorging, ob 127 nur pp155 oder auch noch p145 präzipitierte (Abb 19 g; Abb. 21). Die Autoradiographie des Western-Blots (Abb. 22 e) zeigte durch Vergleich mit dem angefärbten Filterstreifen (Abb. 22 b) jedoch deutlich, daß der Antikörper 127 nur mit pp155 reagierte.

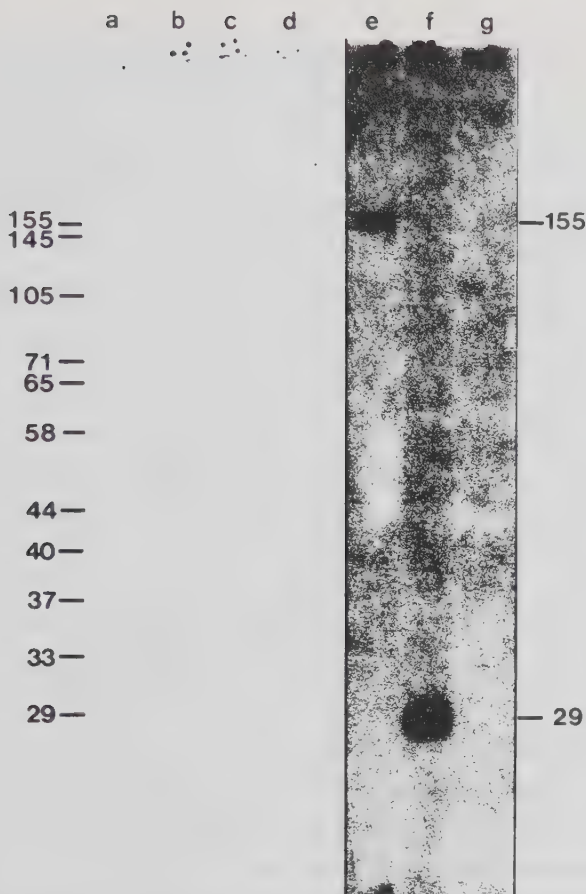


Abb. 22: Elektrophoretischer Transfer (Western-Blot) von Virionproteinen und Immunreaktion mit monoklonalen Antikörpern. Proteine von extrazellulären Virionen (Towne) wurden in einem 15% SDS-PAG aufgetrennt und auf NC-Filter transferiert. Das Filter wurde in Streifen geschnitten. Ein Streifen wurde mit Amidoschwarz gefärbt, um die Positionen der viralen Proteine zu identifizieren (a). Die anderen Streifen wurden nach BSA-Absättigung mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern und anschließend mit ^{125}J -Protein A inkubiert. Dann wurden die Filter ebenfalls mit Amidoschwarz gefärbt (b-d), mit radioaktiver Tinte markiert und exponiert. Die Autoradiographie der Filter ist rechts gezeigt (e-g). Der monoklonale Antikörper 127 reagierte nur mit pp155 (e) und der Antikörper 129 reagierte mit pp29 (f). In der negativen Kontrolle wurde ein Filter mit dem Antikörper Pab421 inkubiert, der gegen ein zelluläres Protein gerichtet ist (g).

Tabelle 3: Monoklonale Antikörper gegen Strukturproteine von HCMV

monoklonale Antikörper	immunpräzipitierte Strukturproteine von HCMV
331, 355	pp71
78, 85, 214, 243 255, 492, 31, 150	gp58 und gp130
128	p200 und p105
127	pp155
108, 142	pp29
157	pp29, pp65 (?), pp86 (?)
244	pp29 (?), pp65 (?), pp86 (?)

Alle in Tabelle 3 aufgeführten monoklonalen Antikörper wurden auf neutralisierende Aktivität untersucht. Die Antikörper wurden einzeln getestet und die Antikörper gegen gp58 und gp130 wurden zusätzlich in Gruppen mit drei verschiedenen Antikörpern getestet. Es konnte jedoch keine Neutralisation der HCMV-Infektion in Zellkultur erreicht werden. Als positive Kontrolle diente ein anti-HCMV Mausserum, das nach intraperitonealer Injektion von gereinigten Viruspartikeln in eine Balb/c Maus gewonnen worden war und vollständig neutralisierte. Als weitere Kontrolle wurde ein monoklonaler Antikörper verwendet, der kein Protein immunpräzipitierte, jedoch bis zu 50% neutralisieren konnte und von Susan Michelson (Pasteur Institut, Paris) zur Verfügung gestellt worden war.

C. Kartierung von Strukturprotein-kodierenden Genen

1. Zellfreie Translation von RNA aus infizierten Zellen

Gesamte zytoplasmatische RNA wurde aus nicht-infizierten (mock) oder infizierten Zellen isoliert. Sehr frühe virale RNA (IE-RNA) wurde 15 Stunden nach HCMV-Infektion in Anwesenheit von Cycloheximid (Proteinsyntheseinhibitor) isoliert, und späte virale RNA wurde 4-6 Tage nach Virusinfektion präpariert. Polyadenylierte (poly(A)⁺) RNA wurde über Oligo(dT)-Säulenchromatographie gewonnen und im zellfreien Retikulytensystem in Anwesenheit von ³⁵S-Methionin translatiert (Pelham and Jackson, 1976). Die Translationsprodukte wurden im SDS-PAG elektrophoretisch aufgetrennt. Abbildung 23 zeigt Polypeptide, die von IE-RNA (Spur b), später RNA (Spur c) und mock-RNA aus nicht-infizierten Zellen (Spur d) translatiert wurden. Als dominantes Translationsprodukt der späten RNA konnte ein 65 Kd Polypeptid (Spur b) identifiziert werden, während die IE-RNA hauptsächlich für zwei Proteine mit dem Molekulargewicht von 72-86 K (IE-Protein, 68-75 Kd, Stinski et al., 1983) und 50-53 K kodierte (Spur c). Diese Proteine wurden als virusspezifisch angesehen, da sie nicht von mock-RNA translatiert wurden (Spur d). In einem weiteren Schritt wurde versucht, in vitro synthetisierte, virusspezifische Proteine über Immunfällung mit HCMV-positiven Patientenserum anzureichern (Abb. 24). Mit dieser Methode konnten neben dem 65 Kd Protein weitere virale Polypeptide identifiziert werden, die von der späten RNA translatiert wurden (Spur b). Diese Proteine konnten weder vom negativen menschlichen Serum erkannt werden (Spur c), noch vom positiven menschlichen Serum bei Immunpräzipitation der translatierten Proteine aus mock-RNA (Spur j). Spur d zeigt, daß der monoklonale Antikörper 355, der gegen das virale Strukturprotein pp71 gerichtet ist (vgl. IV.B.2), ein Protein entsprechender Größe aus Translationsprodukten von später RNA spezifisch präzipitierte. Dieses Protein wurde nicht von IE-RNA oder mock-RNA translatiert (Spur e,h) und kann demnach als virusspezifisches, spätes Protein bezeichnet werden. Der

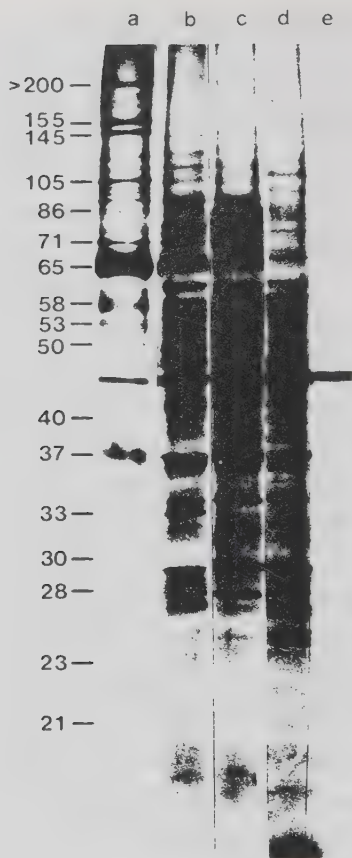


Abb. 23: Zellfreie Translation von RNA. (a) Gesamte Proteine von gereinigten, ^{35}S -markierten Virionen (AD169). (b) in vitro synthetisierte, ^{35}S -markierte Polypeptide von später poly(A)⁺ RNA. (c) in vitro synthetisierte, ^{35}S -markierte Polypeptide von poly(A)⁺ IE-RNA. (d) in vitro synthetisierte, ^{35}S -markierte Polypeptide von gesamter mock-RNA. (e) Endogen synthetisierte Proteine vom zellfreien Retikulozytensystem ohne Zugabe von RNA. Die Proteine wurden in einem 15% SDS-PAG aufgetrennt und fluorographisch dargestellt.

monoklonale Antikörper 127, der mit dem Nukleocapsidprotein pp155 spezifisch reagierte (vgl. IV.B.2), präzipitierte nach in vitro Translation von später RNA ein Protein von 155 Kd und zusätzlich ein etwa 35 Kd

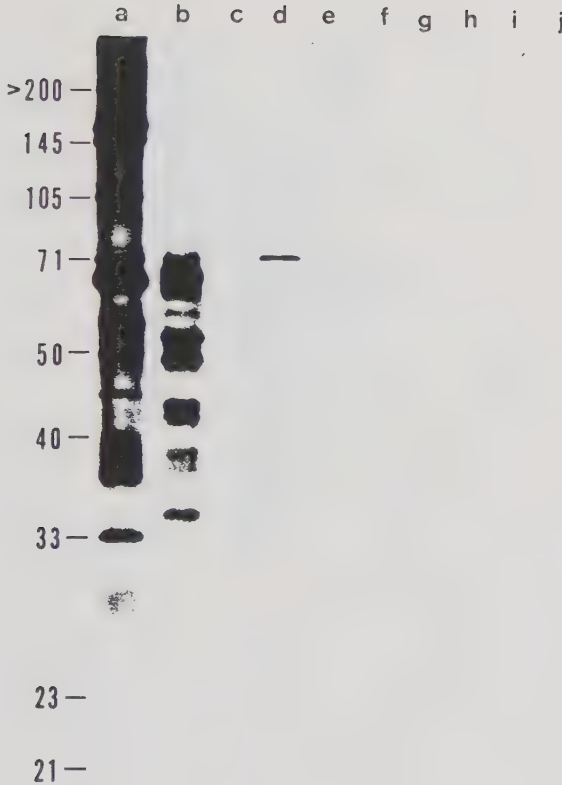


Abb. 24: Zellfreie Translation von RNA mit anschließender Immunpräzipitation der ^{35}S -markierten Translationsprodukte. Gesamte Proteine von gereinigten, ^{35}S -markierten AD169-Virionen (a). Translationsprodukte von später poly(A)⁺ RNA, immunpräzipitiert mit einem HCMV-positiven Patientenserum (b), einem negativen Serum (c) oder dem monoklonalen Antikörper 355 (d). Translationsprodukte von IE poly(A)⁺ RNA, immunpräzipitiert mit dem monoklonalen Antikörper 355 (e) oder dem Antikörper Pab421 (negative Kontrolle) (f). Translationsprodukte von gesamter mock-RNA, immunpräzipitiert mit den monoklonalen Antikörpern Pab421 (g), 355 (h), 85 (i) oder einem HCMV-positiven Patientenserum (j). Die Proteine wurden in einem 15% SDS-PAG aufgetrennt und fluorographisch dargestellt.

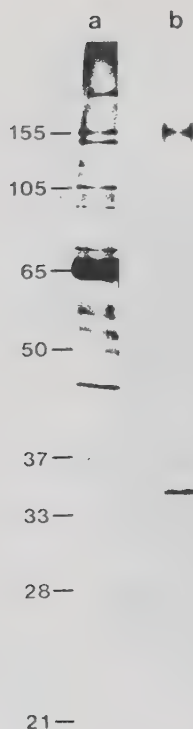


Abb. 25: Zellfreie Translation von später poly(A)⁺ RNA aus infizierten Zellen mit anschließender Immunpräzipitation der ³⁵S-markierten Translationsprodukte. (a) Gesamte Proteine von gereinigten, ³⁵S-markierten Viruspartikeln (AD169). (b) Translationsprodukte von später poly(A)⁺ RNA, immunpräzipitiert mit dem monoklonalen Antikörper 127. Die Proteine wurden in einem 15% SDS-PAG aufgetrennt und fluorographisch dargestellt.

großes, wahrscheinlich als Degradationsprodukt anzusehendes Polypeptid (Abb. 25 b; Abb. 26 e). Bei Immunpräzipitation mit den monoklonalen Antikörpern 108 und 142, welche beide das Virionprotein pp29 erkannten (vgl. IV.B.2), wurden mehrere in vitro synthetisierte Polypeptide mit Größen von etwa 26 K bis 32 K gefällt. Ein Polypeptid von 29,5 Kd war



Abb. 26: Zellfreie Translation von später poly(A)⁺ RNA aus infizierten Zellen mit anschließender Immunpräzipitation der ³⁵S-markierten Translationsprodukte. (a) Gesamte Proteine von gereinigten, ³⁵S-markierten Viruspartikeln (AD169). (b) Translationsprodukte von später poly(A)⁺ RNA, immunpräzipitiert mit einem HCMV-positiven Patientenserum. Die folgenden Spuren zeigen Translationsprodukte von später poly(A)⁺ RNA, nach Immunpräzipitation mit den monoklonalen Antikörpern 355 (c), Pab421 (d), 127 (e), 108/142 (f) und mit einer Mischung von monoklonalen Antikörpern gegen gp58 und gp130 (g). Die Proteine wurden in einem 15% SDS-PAG aufgetrennt und fluorographisch dargestellt. Die Belichtungszeit betrug 10 Tage (a-c), bzw. 40 Tage (d-g).

jedoch am stärksten ausgeprägt (Abb. 26 f). Die monoklonalen Antikörper gegen gp58 und gp130 präzipitierten einzeln oder in Gruppen von mehreren Antikörpern ein Translationsprodukt von 48 Kd (Abb. 26 g). Von allen Antikörpern, auch von Pab421 (monoklonaler Antikörper gegen ein zelluläres Protein, Gurney et al., 1980), wurde das dominante Translationsprodukt von 65 Kd in geringen Mengen mitgefällt, welches bei kurzer Belichtungszeit nicht zu sehen war (Abb. 26).

Auf Grund dieser Ergebnisse sollte im folgenden versucht werden, über Hybridselektion der RNA mit viralen DNA-Abschnitten und anschließende in vitro Translation und Immunpräzipitation, Gene von viralen Strukturproteinen zu kartieren.

2. Kartierung von viralen Genen über Hybridselektion und zellfreie Translation von viraler RNA

Für die Hybridselektion von später viraler RNA wurden acht Cosmid-Klone eingesetzt, die das gesamte Genom des menschlichen CMV Stamm AD169 beinhalteten (Fleckenstein et al., 1982). Ein Teil dieser Klone enthielt überlappende virale DNA-Sequenzen (Abb. 27). Gereinigte cosmid-klonierte DNA wurde an Nitrozellulose-Filter gebunden und mit später poly(A)⁺ RNA aus infizierten Zellen hybridisiert. Die gebundene RNA wurde eluiert und im zellfreien Retikulozytensystem translatiert. Abbildung 28 zeigt die Translationsprodukte der RNA Moleküle, die mit verschiedenen Cosmid-Klonen hybrid-selektiert wurden. Das Polypeptidmuster war für jeden Klon charakteristisch. Translatierte RNA von überlappenden Klonen, wie z. B. 1017/1015 zeigten ein ähnliches Bandenmuster. Die prominentesten Polypeptide wurden nach Selektion mit den Klonen pCM1007 und pCM1017/1015 synthetisiert. Das dominante Translationsprodukt von 65 Kd wurde mit Klon pCM1007 selektioniert. Ein Protein entsprechender Größe kommt bei gereinigten Viruspartikeln ebenfalls in großer Menge vor (Abb. 28 a). Tabelle 4 gibt eine Zusammenfassung der Molekulargewichte einzelner Proteinbanden, die den Cosmid-Klonen zugeordnet werden kann-

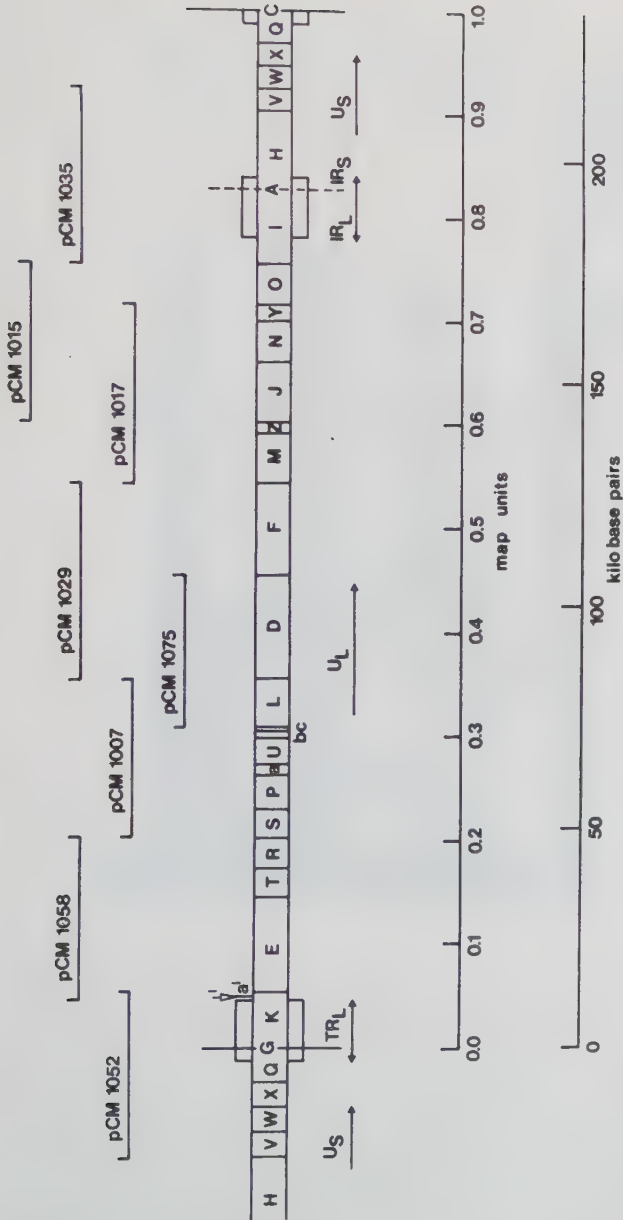


Abb. 27: Schnittstellen der Restriktionsendonuklease HindIII im Genom des menschlichen Cytomegalovirus Stamm AD169. Virale DNA Moleküle enthalten eine lange (U_L) und eine kurze (U_S) nicht-repetitive Sequenz, die jeweils von einem Paar inverser repetitiver Sequenzen eingeschlossen sind (TR_L/IR_L und TR_S/IR_S). Acht Cosmid-Klone sind durch horizontale Klammern dargestellt und enthalten die genetische Information des gesamten viralen Genoms.

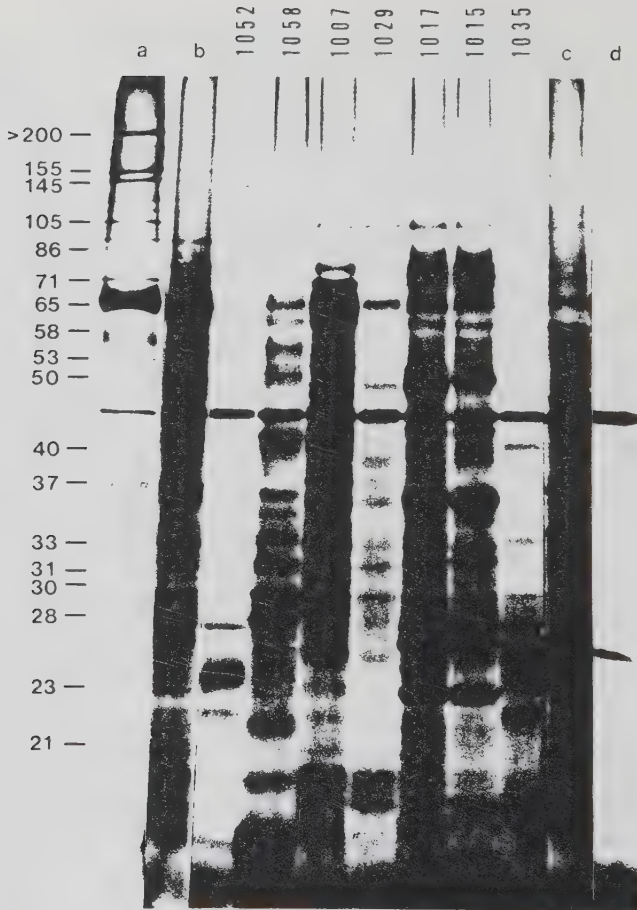


Abb. 28: Zellfreie Translation von später poly(A)⁺ RNA aus infizierten Zellen, nach Hybridisierung der RNA zu cosmid-klonierter viraler DNA. (a) Gesamte Proteine von gereinigten, ³⁵S-markierten Viruspartikeln (AD169). (b) ³⁵S-markierte Translationsprodukte von später poly(A)⁺ RNA. Die folgenden Spuren zeigen ³⁵S-markierte Translationsprodukte der hybrid-selektierten späten poly(A)⁺ RNA. Die Nummern der zur Hybridisierung verwendeten Cosmid-Klone sind über der jeweiligen Spur angegeben (vgl. Abb. 27). (c) ³⁵S-markierte Translationsprodukte von gesamter mock-RNA. (d) Endogen synthetisierte Proteine, ohne Zugabe von RNA. Die Proteine wurden in einem 15% SDS-PAG aufgetrennt und fluorographisch dargestellt.

Tabelle 4^a

pCM1052	pCM1058	pCM1007	pCM1029	pCM1017	pCM1015	pCM1035
		145		155	155	
			110			
	90	90				
		86				
		76		77	77	
74						74
		71		73	73	
				70,5	70,5	
		65				
		62				
	55					
		54				
			53			
		52				
	51			51		
				50	50	
						49,5
		49	49	49		
		47				
		45				
		43				
	42	42		42,5	42,5	
41,5		38	41,5			41,5
		36		37	37	
				34		
33,5		33		32,5	32,5	33,5
	32					
	28	29		28	28	27
27				26	26	
				24		
23,5				23	23	23,5
22,5						22,5
	22					

^a Größen ($\times 10^3$) von Polypeptiden, die in vitro von später viraler RNA translatiert wurden, nach Hybridisierung der RNA zu sieben Cosmid-Klonen, welche die genetische Information des gesamten HCMV-Genoms enthielten. Die Tabelle stellt eine Zusammenfassung der Ergebnisse von wiederholten Experimenten dar.

Tabelle 5: Polypeptide von hybrid-selektierter in vitro Translation mit gleicher Größe wie virale Strukturproteine

<u>in vitro</u> synthetisierte Polypeptide	selektierende HindIII DNA-Fragmente
155 ^{a, b}	J - Y
145	a, U
86 ^b	a, U
71 ^{a, b}	b, c, L
65 ^b	b, c, L
53	D - F
50	Y - O
37	J - Y
33	U

^a Immunpräzipitationen mit monoklonalen Antikörpern zeigten, daß diese in vitro synthetisierten Polypeptide den nativen phosphorylierten Virionproteinen homolog sind.

^b Die Polypeptide zeigten im Proteingel gleiches Wanderungsverhalten wie native phosphorylierte Virionproteine.

ten. Keines dieser Polypeptide wanderte im Gel mit einem in vitro synthetisierten Protein von mock-RNA. Einige der in Tabelle 4 aufgeführten Polypeptide schienen gleiches Molekulargewicht zu haben, wie Virionproteine oder virusspezifische Proteine aus infizierten Zellen. Andere in vitro synthetisierte Produkte könnten durch Degradation oder vorzeitigen Syntheseabbruch entstanden sein.

Die in vitro synthetisierten Polypeptide, die auf Grund ihres Molekulargewichts im Proteingel mit Strukturproteinen von gereinigten Viruspartikeln korreliert werden konnten, sind in Tabelle 5 aufgelistet. Anhand von überlappenden Klonen und subklonierten HindIII DNA-Fragmenten wurden die kodierenden Sequenzen für diese Proteine näher bestimmt. So konnte das Gen für das phosphorylierte Nukleocapsidprotein von 155 Kd

und das mögliche Gen für das Nukleocapsidprotein von 145 Kd den HindIII DNA-Fragmenten J, N, Y, bzw. a und U zugeordnet werden. Im allgemeinen ließen sich diese hochmolekularen Polypeptide im in vitro Translations-system nicht effizient synthetisieren. Die Effizienz konnte gesteigert werden, wenn die RNA über Hybridisierung mit subklonierten DNA-Fragmenten selektiert wurde (s. Abb. 33).

3. Kodierende Sequenzen für phosphorylierte Virionproteine

Ziel der folgenden Experimente war es, nach hybrid-selektierter in vitro Translation, über Immunpräzipitation mit monoklonalen Antikörpern, die Zuordnung zu in vivo vorkommenden Virionproteinen zu finden. Späte poly(A)⁺ RNA aus infizierten Zellen wurde mit sieben Cosmid-Klonen hybridisiert und in vitro translatiert. Nach anschließender Immunpräzipitation mit dem monoklonalen Antikörper 127 wurde ein 155 Kd großes Polypeptid aus den Translationsprodukten der RNA präzipitiert, die von den Cosmid-Klonen pCM1017 und pCM1015 selektiert worden war. Das Gen für pp155 konnte demnach auf den HindIII Fragmenten J, N, oder Y vermutet werden (Abb. 27; Tabelle 5). Es muß noch abgeklärt werden, ob auch die nicht überlappenden HindIII Fragmente Z und O einen Teil der kodierenden Sequenzen für pp155 enthalten.

Der monoklonale Antikörper 355 gegen pp71 präzipitierte ein Polypeptid, das von der RNA translatiert wurde, die zu Cosmid-Klon pCM1007 hybridisiert hatte (Abb. 29). Die kodierende Sequenz für dieses Protein, das in vivo und in vitro ein Molekulargewicht von 71 K hatte, wurde näher bestimmt. Die HindIII Fragmente des Cosmid-Klons pCM1007 wurden in den Plasmid-Vektor pACYC184 subkloniert und bei der Hybridselektion eingesetzt. Abbildung 30 zeigt, daß das Gen für pp71 auf den HindIII Fragmenten b, c und L liegt. Die gleichen Subklone selektierten für eine mRNA, die für das 65 Kd große Translationsprodukt kodierte. Dieses in vitro synthetisierte Polypeptid wanderte im Gel wie das dominante Phosphoprotein von 65 Kd bei gereinigten Viruspartikeln (Tabelle 5). Nach

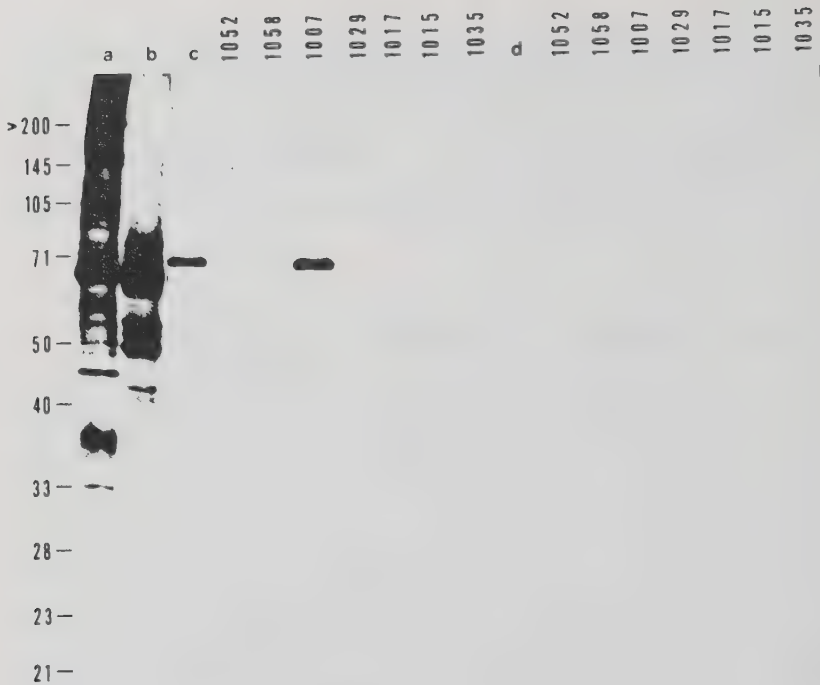


Abb. 29: Immunpräzipitation von Translationsprodukten hybrid-selektierter RNA. (a) Gesamte Proteine von gereinigten, ^{35}S -markierten Viruspartikeln (AD169). (b) ^{35}S -markierte Translationsprodukte von später poly(A) $^{+}$ RNA, immunpräzipitiert mit einem HCMV-positiven Patientenserum oder (c) mit dem monoklonalen Antikörper 355. In den folgenden Spuren wurde späte poly(A) $^{+}$ RNA aus infizierten Zellen zu sieben Cosmid-Klonen hybrid-selektiert, anschließend in vitro translatiert, und die ^{35}S -markierten Translationsprodukte wurden mit dem monoklonalen Antikörper 355 präzipitiert. (d) ^{35}S -markierte Translationsprodukte von später poly(A) $^{+}$ RNA, immunpräzipitiert mit Pab421 (negative Kontrolle). In den folgenden Spuren wurde die hybrid-selektierte RNA in vitro translatiert, und die ^{35}S -markierten Translationsprodukte wurden mit dem Antikörper Pab421 präzipitiert. Die Proteine wurden in einem 15% SDS-PAG aufgetrennt und fluorographisch dargestellt.

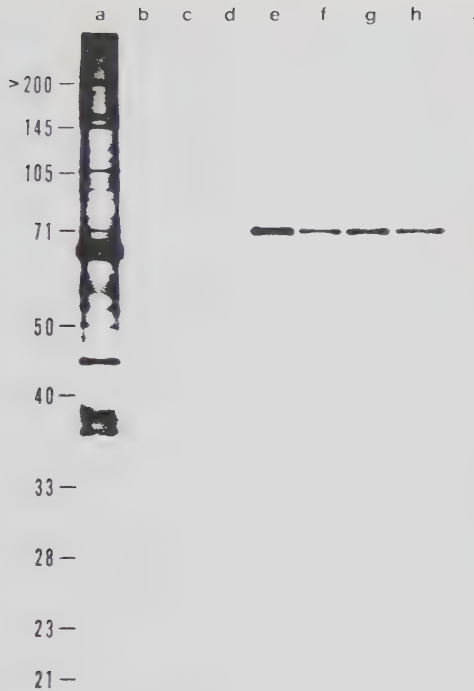


Abb. 30: Immunpräzipitation von Translationsprodukten hybrid-selektierter RNA. (a) Gesamte Proteine von gereinigten, ^{35}S -markierten Viruspartikeln (AD169). In den folgenden Spuren wurde späte poly(A)⁺ RNA aus AD169-infizierten Zellen zu den HindIII Fragmenten S, P, a, b+c, b, c, L+D (Spuren b-h) hybrid-selektiert, anschließend in vitro translatiert, und die ^{35}S -markierten Translationsprodukte wurden mit dem monoklonalen Antikörper 355 präzipitiert. Die Proteine wurden in einem 15% SDS-PAG aufgetrennt und fluorographisch dargestellt.

Translation der RNA, die mit den HindIII Fragmenten b und c hybridisierte, erschienen die in vitro synthetisierten Polypeptide von 65 Kd und 71 Kd in gleichbleibenden Mengenverhältnissen. Dagegen selektierte das HindIII Fragment L stärker die RNA-Moleküle, die für das 71 Kd Polypeptid kodierten und weniger die RNA für das 65 Kd Polypeptid.

4. Transkripte für die viralen Proteine von 65 Kd und 71 Kd

Über Einzelstrangklonierung sollte geprüft werden, ob die Transkripte für das 65 Kd und das 71 Kd Polypeptid von dem selben DNA-Strang kodiert wurden. Gleichzeitig sollte die Richtung der Transkription festgestellt werden. Das HindIII Fragment c wurde in die HindIII Schnittstelle der replikativen Form des Bakteriophagen M13mp9 (Messing et al., 1981) in beiden Orientierungen kloniert. Die Richtung des etwa 800 Basenpaare großen c-Fragments konnte über die asymmetrisch gelegene EcoRI Schnittstelle bestimmt werden (Abb. 31). Einzelsträngige Phagen-DNA, die das inserierte HindIII Fragment c in der einen oder in der anderen Richtung enthielt, wurde jeweils mit später poly(A)⁺ RNA aus AD169-infizierten Zellen hybridisiert. Nach Elution und in vitro Translation der RNA wurden die Translationsprodukte mit dem monoklonalen Antikörper 355 immunpräzipitiert. Der DNA-Strang, welcher in dem festgelegten Prototyp des AD169-Genoms (Fleckenstein et al., 1982) in der 3' → 5' Orientierung lag, selektierte die mRNA des 71 Kd Polypeptids (Abb. 32 k). Die Transkriptionsrichtung verläuft demnach im Prototyp von links nach rechts (Abb. 31), und die Promotorsequenz ist im HindIII Fragment b lokalisiert, falls "splicing" keine nennenswerte Rolle spielt. Wenn die Translationsprodukte der hybrid-selektierten mRNA ohne Immunpräzipitation im Proteingel aufgetrennt wurden, konnte gezeigt werden, daß die mRNA für das 65 Kd Polypeptid vom selben M13mp9-Klon hybrid-selektiert wurde, wie die mRNA für das 71 Kd Polypeptid (Abb. 33 g).

In den folgenden Experimenten sollten die Größen der mRNA-Moleküle be-

stimmt werden, die für die Polypeptide von 65 Kd und 71 Kd kodierten. RNA wurde aus lytisch infizierten Zellen isoliert, in polyadenylierte und nicht-adenylierte RNA getrennt, und die RNA von beiden Fraktionen wurde im Agarose-Gel aufgetrennt. Nach Übertragen der RNA auf Nitrozellulose-Filter wurde mit 32 P-markierten HindIII Fragmenten der viralen DNA hybridisiert (Abb. 34). Ein in großen Mengen vorhandenes spätes mRNA Transkript von etwa 4 Kilobasen (Kb) hybridisierte mit den HindIII Fragmenten b, c und L/D, jedoch nicht mehr mit dem HindIII Fragment U. Die 4 Kb mRNA hybridisierte mit dem gleichen Satz von

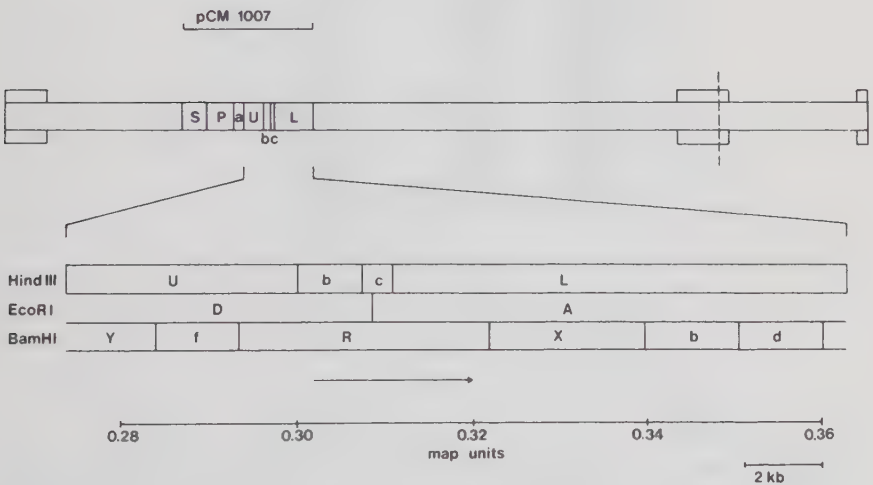


Abb. 31: Restriktionsenzymkarte für den DNA-Abschnitt von HCMV (AD169), der für die Virusproteine von 65 Kd und 71 Kd kodiert. Die HindIII Fragmente U, b, c und L des Cosmid-Klons pCM1007 sind in vergrößertem Maßstab gezeichnet (Fleckenstein et al., 1982). Die einzige Schnittstelle für EcoRI in dieser Region ist angegeben, und die Positionen der Schnittstellen für BamHI wurden von Greenaway et al. (1982) übernommen. Der Pfeil gibt die Richtung der Transkription und die Lokalisation der kodierenden Sequenzen für die beiden Polypeptide von 65 Kd und 71 Kd an.

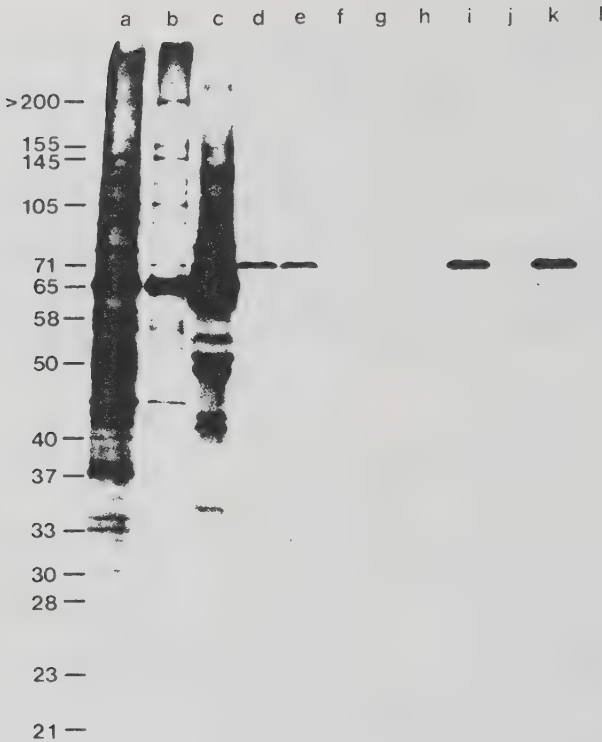


Abb. 32: Immunpräzipitation von Translationsprodukten hybrid-selektierter RNA. (a) ^{35}S -markierte Proteine von Extrakten aus AD169-infizierten Zellen. (b) Gesamte Proteine von gereinigten, ^{35}S -markierten Viruspartikeln (AD169). (c) ^{35}S -markierte Translationsprodukte von später poly(A)⁺ RNA, immunpräzipitiert mit einem HCMV-positiven Patientenserum, (d, e) mit dem monoklonalen Antikörper 355 oder (f) mit dem monoklonalen Antikörper 2A6 gegen ein Adenovirus-Protein (negative Kontrolle). In den folgenden Spuren wurde späte poly(A)⁺ RNA aus AD169-infizierten Zellen zu den plasmid-klonierten HindIII Fragmenten a, U, c (Spuren g, h, i), zu dem im Bakteriophagen-Vektor M13mp9 in beiden Orientierungen klonierten HindIII Fragment c (Spuren j und k) und zur M13mp9 Vektor-DNA (Spur l) hybridisiert. Die eluierte RNA wurde translatiert und die Produkte mit dem Antikörper 355 präzipitiert. Die Proteine wurden in einem 15% SDS-PAG aufgetrennt und fluorographisch dargestellt .

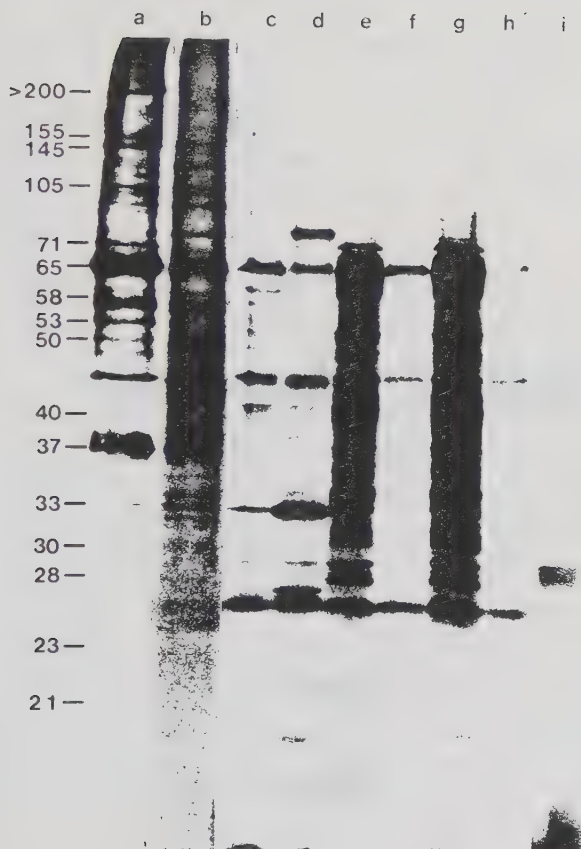
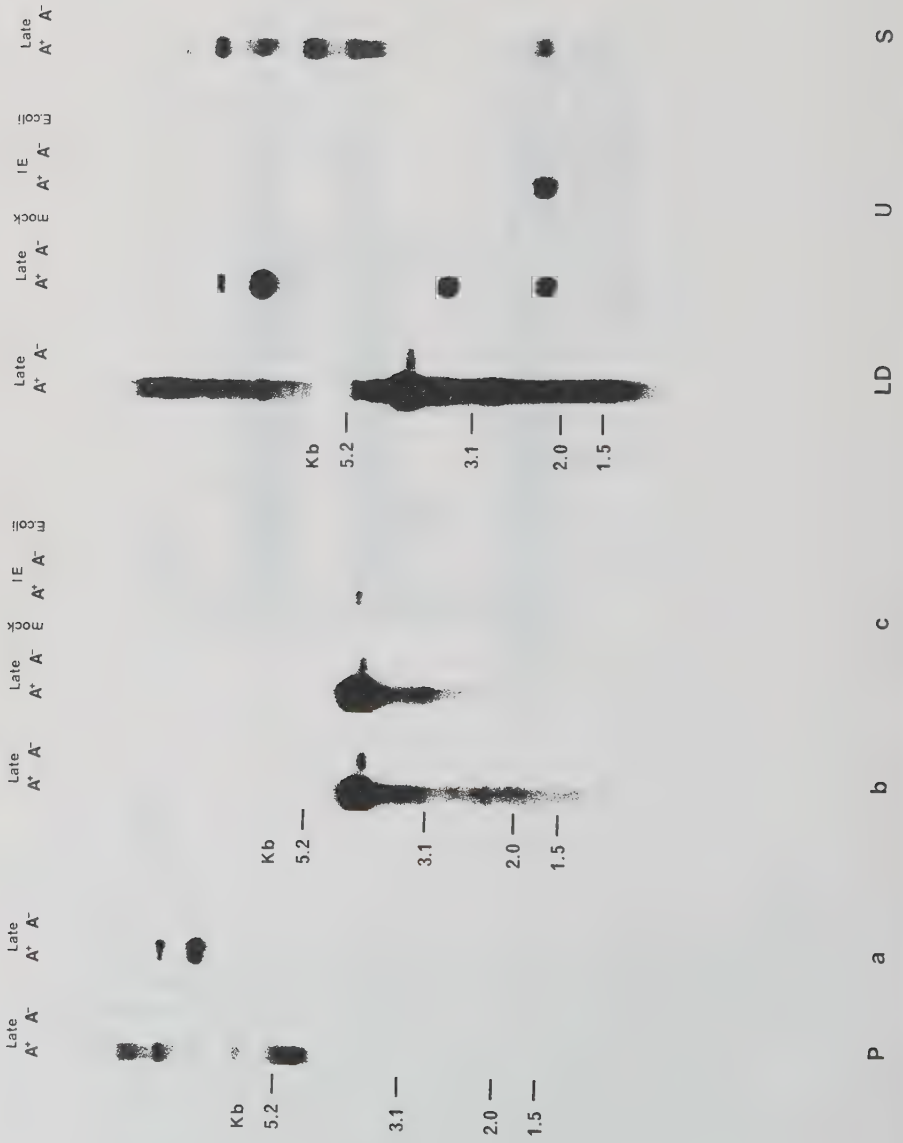


Abb. 33: Translationsprodukte von hybrid-selektierter RNA. (a) Gesamte Proteine von gereinigten, ^{35}S -markierten Viruspartikeln (AD169). (b) ^{35}S -markierte Proteine von Extrakten aus AD169-infizierten Zellen. In den folgenden Spuren wurde späte poly (A)⁺ RNA aus AD169-infizierten Zellen zu den plasmid-klonierten HindIII Fragmenten a, U, c (Spuren c, d, e), zu dem im Bakteriophagen-Vektor M13mp9 in beiden Orientierungen klonierten HindIII Fragment c (Spuren f und g) und zur M13mp9 Vektor-DNA (Spur h) hybridisiert. (i) Im zellfreien System endogen synthetisierte Proteine ohne Zugabe von RNA. Die Proteine wurden in einem 15% SDS-PAG aufgetrennt und fluorographisch dargestellt.



HindIII Fragmenten, der auch die RNA für die beiden Polypeptide von 65 Kd und 71 Kd hybrid-selektierte. Daraus konnte gefolgert werden, daß entweder eine einzige 4 Kb mRNA für die beiden Virusproteine kodiert oder aber die mRNA-Moleküle für beide Polypeptide nahezu identisch in der Größe sind. Eine weitere Alternative könnte sein, daß pp71 von einer der kleineren, in sehr geringen Mengen vorhandenen mRNAs translatiert wird.

Um zwischen diesen Möglichkeiten zu entscheiden, wurde späte poly(A)⁺ RNA über Sedimentation im Saccharosegradienten nach der Größe fraktioniert. RNA von jeder Fraktion wurde sowohl über Northern-Blot Hybridisierung mit dem ³²P-markierten HindIII Fragment c analysiert, als auch in der zellfreien Translation. Die Translationsprodukte wurden mit dem monoklonalen Antikörper 355 und mit HCMV-positiven Patientenserum immungefällt. Abbildung 35 A zeigt, daß die höchste Konzentration der mRNA-Moleküle, die für das 71 Kd Polypeptid kodierten, in Fraktion 12 war. Die selbe Fraktion enthielt ebenfalls die Masse an mRNA für das 65 Kd Polypeptid (Abb. 35 B). Ein Vergleich mit dem Northern-Blot zeigte, daß in Fraktion 12 die Menge der 4 Kb RNA am höchsten war (Abb. 36). Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, daß die mRNA-Moleküle, die für pp71 und das 65 Kd Polypeptid kodieren, gleiche Größe haben, auf

Abb. 34: Autoradiographie von Northern-Blot Hybridisierungen der HindIII DNA-Fragmente zu später, sehr früher oder mock-RNA. RNA wurde aus nicht-infizierten (mock) oder aus AD169-infizierten Zellen spät nach Infektion (late) geerntet. Sehr frühe (IE) RNA wurde 15 Stunden nach Infektion mit AD169 in Anwesenheit von Cycloheximid isoliert. Die späte RNA und die IE-RNA wurden in die polyadenylierte (A⁺) und nicht-adenylierte (A⁻) Fraktion getrennt und denaturiert. Im Agarose-Gel wurden 2,5 µg der poly (A)⁺ oder der poly(A)⁻ RNA, 10 µg der mock-RNA und 7,5 µg einer E. coli RNA aufgetrennt und auf Nitrozellulose-Filter transferiert. Die plasmid-klonierten HindIII Fragmente P, a, b, c, U, S und der Cosmid-Klon pCM1075 (HindIII L+D) wurden in vitro mit ³²P markiert und mit der transferierten RNA hybridisiert.

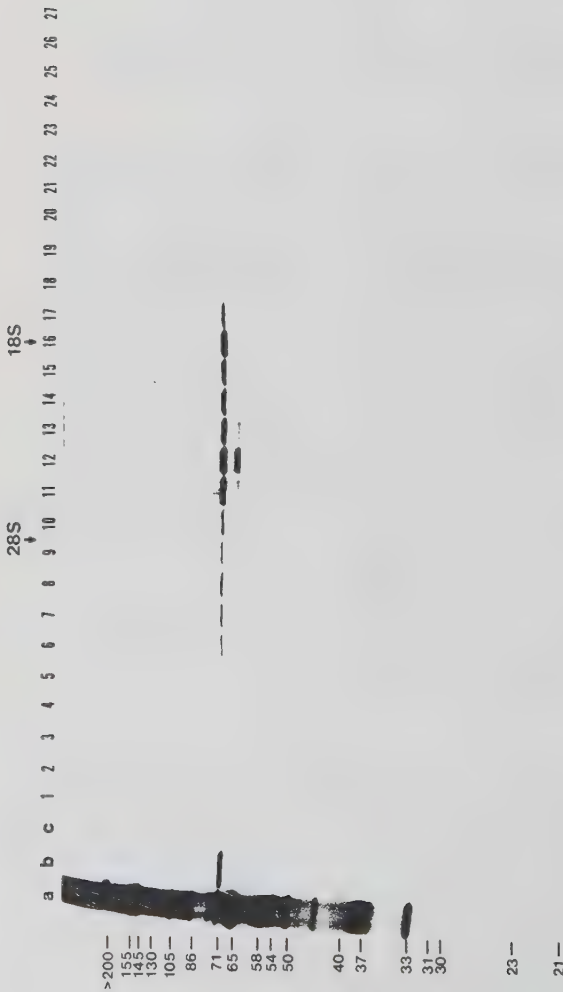


Abb. 35: Immunpräzipitation der Translationsprodukte von großen-fraktionierter RNA. Späte poly(A)⁺ RNA aus AD169-infizierten Zellen wurde nach der Größe im Saccharose-Formamid-Gradienten fraktioniert. Die RNA jeder Fraktion (1 - 27) wurde mit Äthanol präzipitiert, und die Hälfte der RNA wurde in vitro translatiert. Die Translationsprodukte wurden in zwei Proben geteilt. Eine Probe jeder Fraktion wurde mit dem monoklonalen Antikörper 355 inkubiert (Abb. 35 A), die andere Probe mit einem HCMV-positiven Patientenserum (Abb. 35 B). Die präzipitierten Proteine wurden in einem 15% SDS-PAG aufgetrennt und fluorographisch dargestellt.



Forts.: Abb. 35 A: (a) Gesamte Proteine von gereinigten, ^{35}S -markierten Viruspartikeln (AD169).
(b) ^{35}S -markierte Translationsprodukte von später poly(A)+ RNA, immunpräzipitiert mit dem Antikörper 355 oder (c) mit dem Antikörper 2A6 (negative Kontrolle). Abb. 35 B: ^{35}S -markierte Proteine (a) von Extrakten aus nicht-infizierten Zellen, (b) von Extrakten aus AD169-infizierten Zellen, (c) von gereinigten Viruspartikeln. (d) ^{35}S -markierte Translationsprodukte von später poly(A)+ RNA, präzipitiert mit einem HCMV-positiven Serum.



Abb. 36: Autoradiographie einer Northern-Blot Hybridisierung des HindIII c-Fragments zu größen-fraktionierter RNA. Späte poly(A)⁺ RNA aus AD169-infizierten Zellen wurde nach der Größe im Saccharose-Formamid-Gradienten fraktioniert. Die Hälfte der RNA von jeder Fraktion (1 - 27) (vgl. Abb. 35) wurde nach Äthanol-Präzipitation im Agarose-Gel aufgetrennt und auf Nitrozellulose-Filter transferiert. Das plasmid-klonierte HindIII c-Fragment wurde in vitro mit ³²P markiert und mit der transferierten RNA hybridisiert. In den ersten drei Spuren wurde zu transferierter E. coli RNA, später (late) poly(A)⁻ RNA und poly(A)⁺ RNA hybridisiert.

dem selben Genomabschnitt lokalisiert sind und vom selben DNA-Strang transkribiert werden. Abbildung 35 A zeigt, daß das 71 Kd Polypeptid auch von kleineren mRNA-Molekülen in vitro synthetisiert werden kann-

te, vor allem von RNA-Molekülen mit einer Größe von etwa 1,9 Kb (Fraktion 16). Dabei könnte es sich um degradierte poly(A)⁺ RNA handeln, die gerade noch ausreicht, pp71 vollständig zu synthetisieren, oder es existiert eine zweite kleinere RNA-Spezies für pp71.

V. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst versucht, ein umfassendes Bild über die Strukturproteine des menschlichen Cytomegalovirus zu erhalten. Die von einer Vielzahl von Autoren vorliegenden Berichte über Zahl, Größe und Glycosylierung der Strukturproteine weisen zum Teil erhebliche Diskrepanzen auf (Sarov and Abady, 1975; Fiala et al., 1976; Kim et al., 1976; Stinski, 1976; Gupta et al., 1977; Schmitz et al., 1980; Siqueira-Linhares et al., 1981). In vielen Studien über gereinigte extrazelluläre Viruspartikel wurde die Identität der viralen Strukturproteine nicht über eine Coelektrophorese mit zellulären Proteinen mock-infizierter Zellen abgesichert. Häufig fehlen Angaben darüber, ob eine Kontamination mit frühen viralen Proteinen oder Proteinen von Mycoplasmen ausgeschlossen wurde. Es ist bekannt, daß Mycoplasmen häufig latent in Zellkulturen vorkommen und die Kontamination makroskopisch und mikroskopisch meist nicht zu erkennen ist (Levine et al., 1968; Stanbridge, 1971; Brown et al., 1974). Wenig wurde über die Lokalisation der Proteine im Virion, den immunogenen Eigenschaften und den Modifikationen der Proteine veröffentlicht. Die genaue Zahl der Strukturproteine des menschlichen Cytomegalovirus anzugeben, ist nicht unmittelbar möglich. Wie man von der hohen Komplexität des Genoms erwarten kann, kodiert das Virus für eine große Anzahl von nicht-strukturellen und strukturellen Proteinen. Die Virusreinigung ist schwierig, im Vergleich zu der von vielen anderen Herpesviren, und extrazelluläre Viruspartikel sind oft mit defekten und DB-Partikeln vermischt (Stinski et al., 1976).

In dieser Arbeit wurden 25 Proteine als Komponenten des extrazellulär gereinigten HCMV-Partikels gezählt. Wichtige Kriterien, die für ein virales Strukturprotein sprachen, waren, daß das Protein dem Nukleocapsid oder der Hülle mit Tegument zugeordnet werden konnte und daß es von hochtitrigen Rekonvaleszentenseren erkannt wurde. Weiter wurde

großen Wert darauf gelegt, daß diese Proteine nicht zelluläre Kontaminanten darstellten oder frühe virusspezifische Proteine repräsentierten. Daher wurden Proteine, die in mock-infizierten Zellen, HCMV-infizierten Zellen, Virionen aus Zytoplasma oder in DB-Partikeln in größeren Mengen vorkamen als in gereinigten extrazellulären Virionen, nicht als strukturelle Komponenten des reifen Viruspartikels gezählt. Kontaminationen mit Proteinen von Mycoplasmen wurden ausgeschlossen, indem Zellkulturen verwendet wurden, die anhand der Tests frei von Mycoplasmen waren und kontaminierte Virusstocks über die Transfektion viraler DNA gereinigt wurden. Die in Tabelle 1 aufgeführten Strukturproteine stellen eine minimale Anzahl dar. Es können zusätzlich Proteine existieren, die von dominanten Polypeptiden im Gel überlagert wurden oder nicht ausreichend markiert werden konnten. Von vier Proteinen (p54/53, p40, p37, pp29) ließ sich wegen geringer radioaktiver Markierung keine Aussage über die Lokalisation im Virion machen. Aber alle vier Polypeptide reagierten mit Antikörpern von hochtitrigen menschlichen Rekonvaleszenten. Beim Protein p54/53 könnte es sich kaum um ein zelluläres Protein handeln, da es abhängig vom Virusstamm sein Molekulargewicht änderte. Für die Annahme, daß pp29 ein virales Strukturprotein ist, sprach, daß es in mock-infizierten Zellen fehlte und daß es in infizierten Zellen in einer zweiten höhermolekularen Form vorlag, die offensichtlich bei der Reifung des Viruspartikels in die kleinere Form verändert wurde (Abb. 10 a,b,d). Einige der kleineren viralen Strukturproteine reagierten nicht mit Antikörpern von Rekonvaleszenten. Gründe dafür könnten sein, daß diese Proteine in zu geringen Mengen vorkamen oder für den menschlichen Organismus nicht antigen waren.

Extrazellulär gereinigte Virionen und aus Zytoplasma gereinigte Viruspartikel unterschieden sich in ihrer Proteinzusammensetzung. Der Unterschied im Proteinmuster zeigte sich am deutlichsten bei den Glycoproteinen. Bei den Virionen aus Zytoplasma stellten sich mindestens drei

weitere Glycoproteine dar, wenn die Mannose-haltigen Polypeptide mit $^{125}\text{J-Con A}$ markiert worden waren (Abb. 8). Es ist nicht bekannt, inwieweit diese Proteine Vorläufer der Glycoproteine gp130, gp94 und gp58 sind. Kim et al. (1976) und Stinski (1977) berichteten von mehr als drei Glycoproteinspezies in extrazellulären Viruspartikeln bei Markierung mit $^{14}\text{C-}$, bzw. $^3\text{H-Glucosamin}$. Bei der Markierung der Glycoproteine während der Virusreplikation können die angebotenen radioaktiven Zucker metabolisiert werden, und das radioaktive Atom kann in nicht-modifizierten Polypeptiden erscheinen. In dieser Arbeit wurde deshalb 6- $[\text{}^3\text{H}]$ Glucosamin verwendet, das sich bei der Markierung von Glycoproteinen in anderen Virussystemen bewährt hatte und nicht in andere Zucker oder Aminosäuren konvertierte (Lohmeyer and Klenk, 1979). Ein radioaktiver Einbau erfolgte in vier HCMV-Proteine, die im Gel in sehr breite Banden aufgetrennt wurden. Bei der indirekten Markierung der Glycoproteine mit $^{125}\text{J-Con A}$ wurde das größte glycosylierte Polypeptid (>155) als Vorläuferprotein oder als Kontamination eines zellulären und/oder frühen viralen Proteins interpretiert. In den extrazellulären Virionen wären demnach nur drei Glycoproteinspezies enthalten (gp130, gp94, gp58). Die Frage bleibt allerdings, ob mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden, sämtliche Glycopeptide entdeckt werden konnten. Bei der NaB^3H_4 -Methode wurden intakte Viruspartikel eingesetzt und somit nur glycosylierte Proteine der Hülle markiert. Con A benötigt für die Bindung an Glycopeptide mindestens zwei, besser mehr Mannosereste, die terminal oder nur an C-2 substituiert sind (Ogata et al., 1975; Krusius et al., 1976). Es ist unbekannt, ob die Glycoproteine des HCMV diese Bedingungen erfüllen.

Drei der fünf phosphorylierten HCMV-Proteine wurden mit dem Nukleocapsid assoziiert gefunden (pp155, pp86, pp65). Besondere Beachtung wird dem Phosphoprotein pp65 geschenkt. Es ist in großen Mengen in gereinigten Viruspartikeln vorhanden und scheint Hauptbestandteil der DB-Partikel zu sein (Fiala et al., 1976; Stinski, 1977). Gibson (1981)

berichtete von einem entsprechenden dominanten Phosphoprotein beim Primaten CMV-Stamm Colburn und vermutete, daß dem Protein eine wesentliche Funktion bei der Zusammensetzung des Viruspartikels zukomme und daß es zwischen Nukleocapsid und Virushülle lokalisiert sei. Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse und der Daten verschiedener Autoren ist nicht klar, ob dieses Protein in erster Linie eine Komponente des DB-Partikels darstellt oder ob es ein Bestandteil des reifen Viruspartikels ist, mit Lokalisation im Nukleocapsid oder starker Bindung an die Oberfläche des Capsids.

Der zweite Teil dieser Arbeit befaßte sich mit der Herstellung monoklonaler Antikörper. Berichte über monoklonale Antikörper gegen HCMV sind bisher gering. Goldstein et al. (1982) beschrieben einen monoklonalen Antikörper gegen das IE-Protein von 68-75 Kd und einen weiteren Antikörper gegen ein frühes HCMV-Protein. Eine andere Gruppe erhielt, nach Immunisierung von Mäusen mit HCMV-infizierten Zellen, monoklonale Antikörper, die spezifisch Proteine von infizierten Zellen erkannten (Pereira et al., 1982). In der vorliegenden Arbeit wird zum ersten Mal über monoklonale Antikörper gegen Strukturproteine von gereinigten Viruspartikeln des menschlichen Cytomegalovirus berichtet. Insgesamt wurden fünf Gruppen von monoklonalen Antikörpern erhalten, die spezifisch mit Virionproteinen reagierten (Tabelle 3). Die meisten Hybridomazellen produzierten Antikörper, welche gegen die glycosylierten Proteine der Virushülle, gp58 und gp130, gerichtet waren. Peptidkarten der beiden Glycoproteine zeigten, daß gp58 und gp130 gemeinsame tryptische Peptide enthalten. Es konnte jedoch nicht geklärt werden, ob gp58 proteolytisch aus gp130 hervorgeht oder ob die kodierenden Sequenzen der beiden Glycoproteine überlappen. Über Immunpräzipitation von gp58 mit monoklonalen Antikörpern konnte die Stammvariabilität in diesem Protein besonders gut demonstriert werden. Beim HCMV-Stamm AD169 hatte gp58 ein scheinbar größeres Molekulargewicht, als das entsprechende Glycopeptid bei Stamm Towne (Abb. 15). Monoklonale Antikörper eignen sich demnach für Unter-

suchungen von Stammvarianten bei HCMV. Es wäre interessant festzustellen, ob das veränderte Glycoprotein für das unterschiedliche Verhalten von AD169 und Towne in Zellkultur verantwortlich ist. Im Vergleich zu Towne benötigte AD169 in der Regel mehr Zeit für den Replikationszyklus und erbrachte geringere Virusausbeute. Eine weitere Hybridoma-Zelllinie (Klon 128) produzierte Antikörper, welche die beiden Hüllproteine p200 und p105 erkannten. Es ist bis jetzt noch nicht bekannt, ob auch diese Proteine übereinstimmende Aminosäuresequenzen besitzen und zueinander in einer Vorläufer-Endprodukt Beziehung stehen oder als Proteinkomplex präzipitiert wurden; die Zelllinie 128 produzierte sehr wenig Antikörper und konnte bislang nicht subkloniert werden. Die drei anderen Klassen von monoklonalen Antikörpern erkannten pp29, das außerhalb vom Nukleocapsid lokalisierte pp71, sowie das mit dem Nukleocapsid assoziierte Phosphoprotein pp155.

Die monoklonalen Antikörper ermöglichten eine weitere Charakterisierung der Strukturproteine. So konnte mit ihrer Hilfe gp130 über Immunpräzipitation angereichert werden, so daß genügend Proteinmengen für die Peptidkartierung und einen Vergleich mit gp58 zur Verfügung standen. Weiter konnte gp130, nach Präzipitation aus der löslichen Proteinfraction, als Komponente der Virushülle klassifiziert werden. Entsprechende Experimente mit pp71 zeigten, daß das Phosphoprotein auf der inneren Seite der Virushülle lokalisiert ist. Die Annahme, bei den beiden Nukleocapsidproteinen pp155/p145 könne es sich um das gleiche Protein handeln, das im Virion sowohl in phosphorylierter (pp155), als auch in nicht-phosphorylierter Form (p145) vorliege (Gibson, persönliche Mitteilung), konnte nicht bestätigt werden. Der monoklonale Antikörper 127 erkannte bei Immunpräzipitationen, wie auch in Western-Blots nur pp155. Darüber hinaus eigneten sich die monoklonalen Antikörper für die Diagnose von HCMV-Infektionen. In Zusammenarbeit mit R. Thomas und J. C. Nicolas konnten Tests entwickelt werden, in denen die monoklonalen Antikörper eingesetzt wurden, um HCMV in menschlichen Urin und in Rachenabstrichen nachzuweisen (Nowak et al., 1984).

Bemerkenswert war, daß bei der Herstellung der monoklonalen Antikörper kein Antikörper erhalten wurde, der stark mit pp65, der Hauptkomponente des Viruspartikels reagierte. Unter den Patientenseren, die im Western-Blot gegen Virionproteine getestet worden waren, befand sich ein Serum, das offensichtlich zu Beginn einer Primärinfektion mit HCMV gewonnen worden war. In diesem Serum befanden sich stark reaktive Antikörper gegen pp155 und pp29. Im Vergleich dazu war die Immunreaktion mit pp65 schwach (Abb. 12 g). Möglicherweise entwickeln auch Mäuse Antikörper gegen pp65 erst relativ spät nach Immunisierung mit HCMV, so daß zum Zeitpunkt der Milzentnahme zumindest die IgG-Antikörper noch gefehlt haben könnten.

Der dritte Abschnitt dieser Arbeit befaßte sich mit der Kartierung von Genen viraler Strukturproteine auf dem HCMV-Genom. Bisher wurde nur ein Gen von HCMV lokalisiert, welches für das IE-Protein von 68-75 Kd kodiert (Stinski et al., 1983). Als sehr viel schwieriger stellte sich die Situation bei der Kartierung der späten Gene dar. Denn ihre Transkription bleibt nicht, wie bei der IE-Expression, auf zwei eng umschriebene Genom-Abschnitte beschränkt, sondern erstreckt sich über das gesamte HCMV-Genom (DeMarchi, 1981; Wathen et al., 1981; Wathen and Stinski, 1982; McDonough and Spector, 1983). Deshalb wurde eine Methode entwickelt, die allgemein für die Identifizierung von späten viralen Genen anwendbar scheint. DNA-Sequenzen, die für virale Proteine kodieren, wurden über Hybridselektion von später viraler mRNA mit anschließender in vitro Translation kartiert. Die in vitro Translation zeigte, daß sämtliche Genombereiche während der späten Phase der Infektion transkribiert werden und die DNA für etwa 50 virusspezifische Proteine kodieren kann (Tabelle 4). Einige dieser Translationsprodukte können von frühen mRNAs, welche in der späten Replikationsphase vorhanden waren, synthetisiert worden sein. Andere in vitro synthetisierte Polypeptide, insbesondere die mit kleinem Molekulargewicht, können durch vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese oder durch Translation von RNA-Fragmenten entstanden sein.

Neun der in vitro synthetisierten Polypeptide entsprachen im Molekulargewicht dem von viralen Strukturproteinen, und ihre kodierenden Sequenzen konnten auf dem Virusgenom weiter eingegrenzt werden (Tabelle 5). Für eine eindeutige Identifizierung schien es jedoch notwendig, die in vitro synthetisierten Polypeptide, über Immunpräzipitation mit monoklonalen Antikörpern mit den nativen Virionproteinen in Beziehung zu setzen. Über diesen Weg konnte der Genombereich und die Transkriptionsrichtung für eine 4 Kb mRNA bestimmt werden, welche für das virale Strukturprotein pp71 kodierte. Überraschend war, daß von einer viralen polyadenylierten RNA gleicher Größe, vom selben Genomabschnitt und mit der gleichen Orientierung, ein 65 Kd Polypeptid translatiert werden konnte. Dieses Polypeptid scheint dem dominanten Protein pp65 der Virionen und DB-Partikeln äquivalent zu sein. Das Leseraster für das 65 Kd Polypeptid scheint sehr weit links auf der 4 Kb mRNA lokalisiert zu sein. Die kodierende Sequenz für pp71 wird weiter rechts vermutet. Dafür sprechen die Ergebnisse der hybrid-selektierten in vitro Translation mit subklonierten DNA-Fragmenten und die Translation von fraktionierter RNA. Es konnte jedoch nicht bestimmt werden, ob oder inwieweit die Leseraster der beiden Proteine überlappen. Es ist auch nicht bekannt, ob die beiden Proteine von einer mRNA oder von zwei verschiedenen, nahezu gleich großen mRNA-Molekülen translatiert wurden. Die Tatsache, daß der monoklonale Antikörper 355 nie ein kleineres in vitro synthetisiertes Protein als 71 Kd präzipitierte, läßt vermuten, daß der C-terminale Teil des Proteins für die Antigen-Antikörper Bindung unentbehrlich ist. Es ist dann auch denkbar, daß die Region für den C-terminalen Teil des 65 Kd Polypeptids und für den N-terminalen Teil des pp71 überlappen und die beiden Proteine identische Sequenzen aufweisen, ohne daß der Antikörper an das 65 Kd Polypeptid binden muß.

Das Gen für pp155 konnte anhand derselben Methode im überlappenden Bereich der beiden Cosmid-Klone 1017/1015 identifiziert werden. Bei der in vitro Synthese des pp155 entstand ein weiteres Translationsprodukt

von etwa 35 Kd, das zusammen mit dem in vitro synthetisierten 155 Kd Polypeptid von dem monoklonalen Antikörper präzipitiert wurde. Das 35 Kd Polypeptid stellte wahrscheinlich ein Degradationsprodukt dar, denn es nahm in dem Maße zu, wie das 155 Kd Polypeptid an Menge abnahm. Eine weitere Eingrenzung des Gens für pp155 ist über hybrid-selektierte in vitro Translation mit subklonierten DNA-Fragmenten in diesem Genomabschnitt geplant. Ebenso sollen die Gene für die Glycoproteine und das Phosphoprotein pp29 identifiziert werden. Hierfür werden aber vermutlich neue methodische Varianten nötig sein, da in vitro synthetisierte Translationsprodukte nach Auftrennung im Gel erst nach sehr langer Belichtung der Filme identifizierbar waren. Ein möglicher Grund, warum besonders das vermeintliche Vorläuferprotein von gp58 in so geringen Mengen translatiert wurde, könnte sein, daß die mRNAs für Glycoproteine, die während der Translation in Zellen membranassoziiert sind (Ghosh, 1980; Lodish et al., 1980), schlecht aus den Zellextrakten isoliert werden können.

Bei HSV dienten intertypische Rekombinanten von ts-Mutanten der Kartierung viraler Gene (Morse et al., 1978). Dieser Ansatz ist für langsam replizierende Viren wie HCMV schwer durchführbar. Die hier vorgestellte Methode der in vitro Translation von hybrid-selektierter mRNA, in Verbindung mit Immunpräzipitation mit monoklonalen Antikörpern, bietet eine allgemein anwendbare Methode für die Identifikation von Genen in komplexen DNA-Viren. Im Hinblick auf die potentielle Onkogenität von HCMV ist nicht damit zu rechnen, daß konventionelle Methoden der Impfstoffherstellung angewandt werden können. Es bietet sich daher an, die lokalisierten Strukturprotein-Gene in geeignete Expressionsvektoren zu inserieren, um virale Strukturkomponenten gentechnologisch zu synthetisieren. Solche Proteine könnten die Grundlage künftiger Impfstoffe und Diagnostika sein.

VI. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode entwickelt, um Gene für virale Strukturproteine auf der DNA des menschlichen Cytomegalovirus (HCMV) zu kartieren. HCMV gehört zur Gruppe der Herpesviren und besitzt erhebliche klinische Bedeutung.

Zunächst wurden die Strukturproteine des gereinigten extrazellulären Viruspartikels identifiziert und auf Modifikationen und Lokalisation im Viruspartikel untersucht. Von den 25 identifizierten Strukturproteinen stellten sich fünf als Phosphoproteine und drei als Glycoproteine dar. Neun der Strukturproteine ließen sich dem Nukleocapsid des Virions zuordnen. Beim Vergleich der HCMV-Stämme AD169 und Towne zeigte sich, daß nur zwei Strukturproteine dieser Stämme ein unterschiedliches Wanderungsverhalten im Polyacrylamid-Gel aufwiesen. Bei einem der Proteine handelte es sich um das dominante Glycoprotein der Virushülle.

Im folgenden Schritt wurden monoklonale Antikörper gegen virale Strukturkomponenten hergestellt. Die Mehrzahl der Antikörper war gegen das dominante Glycoprotein gerichtet und reagierte zusätzlich mit einem zweiten höhermolekularen Glycoprotein. Die beiden glycosylierten Virusproteine besaßen ein teilweise übereinstimmendes Peptidmuster. Drei weitere Klassen von monoklonalen Antikörpern reagierten mit Phosphoproteinen, die innerhalb des Virions lokalisiert waren, und ein monoklonaler Antikörper präzipitierte zwei nicht modifizierte Hüllproteine.

Für die Kartierung von Genen auf dem HCMV-Genom wurde späte virale mRNA isoliert und über Hybridisierung zu cosmid-klonierten viralen DNA-Fragmenten selektiert. Über anschließende in vitro Translation der hybridselektierten RNA konnten die Gene der synthetisierten Polypeptide auf dem HCMV-Genom lokalisiert werden. Neun der in vitro synthetisierten Polypeptide zeigten das gleiche Molekulargewicht wie native Virionproteine. Die Identifikation der kodierenden Sequenzen für ein Nukleocapsid- und ein inneres Hüllprotein von HCMV wurde über die Immunpräzipi-

tation der in vitro synthetisierten Polypeptide mit monoklonalen Antikörpern erreicht. Für das phosphorylierte Protein der Virushülle (pp71) wurde die kodierende Sequenz über Hybridselektion zu subklonierten DNA-Sequenzen weiter eingegrenzt. Die Richtung der Transkription wurde über Hybridselektion zu einzelsträngiger DNA bestimmt, die im Bakteriophagen M13 kloniert war. Über in vitro Translation von nach Größe fraktionierter mRNA, in Verbindung mit Immunpräzipitationen und Northern-Blot-Analysen, konnte die Größe der RNA, die für das Phosphoprotein kodiert, bestimmt werden. Eine mRNA gleicher Größe, vom selben Genombereich und mit gleicher Orientierung, kodierte in vitro für ein Polypeptid, das in Größe und Masse dem dominanten Phosphoprotein in gereinigten extrazellulären Viruspartikeln entspricht.

Die hier entwickelte Methode hat folglich erstmals erlaubt, zwei Strukturprotein-Gene auf dem Virusgenom exakt zu kartieren und die Lokalisation eines weiteren Strukturprotein-Gens des menschlichen Cytomegalovirus vorläufig zu determinieren.

VII. Verzeichnis der Abkürzungen

Ci	Curie
CPE	cytopathogener Effekt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ds	doppelsträngig
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
FKS	fötales Kälberserum
HCMV	menschliches Cytomegalovirus
HFF	menschliche Vorhautfibroblasten
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropylthiogalactosid
K	Kilo
Kb	Kilobasen
KBR	Komplementbindungsreaktion
Kd	Kilodalton
MEM	Minimal Essential Medium nach Eagle
mRNA	Messenger-RNA
μ	mikro
PAG(E)	Polyacrylamid-Gel(elektrophorese)
PFU	Plaque-bildende Einheit
RI	refraktive Index
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
ss	einzelsträngig
ts	Temperatur-sensitiv
V	Volt
Xgal	Galactopyranosid

VIII. Literaturverzeichnis

- Abdallah, P. S., J. B. D. Mark, and T. C. Merigan. 1976. Diagnosis of cytomegalovirus pneumonia in compromised hosts. *Am. J. Med.* 61, 326-332.
- Aviv, H., and P. Leder. 1972. Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 1408-1412.
- Baumann H., and D. Doyle. 1978. Turnover of plasma membrane glycoproteins and glycolipids of hepatoma tissue culture cells. *J. Biol. Chem.* 253, 4408-4418.
- Benyesh-Melnick, M., F. Probstmeyer, R. McCombs, J. B. Brunschwig, and V. Vonka. 1966. Correlation between infectivity and physical virus particles in human cytomegalovirus. *J. Bacteriol.* 92, 1555-1561.
- Blanton, R. A., and M. J. Tevethia. 1981. Immunoprecipitation of virus-specific immediate-early and early polypeptides from cells lytically infected with human cytomegalovirus strain AD169. *Virology* 112, 262-273.
- Bodemer, W., W. C. Summers, and J. C. Niederman. 1980. Detection of virus-specific antigens in EB-(P3HR-1) virus superinfected Raji cells by immunoprecipitation. *Virology* 103, 340-349.
- Bolton, A. E., and W. M. Hunter. 1973. The labeling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a ¹²⁵J-containing acylating agent. Application to the radioimmunoassay. *Biochem. J.* 133, 529-539.
- Bolton, A. E., J. G. Bennie, and W. M. Hunter. 1976. Innovations in labeling techniques for radioimmunoassays. *Proceedings of the 24th Colloquium Brugge*, 687-693.

- Bonner, W. M., and R. A. Laskey. 1974. A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* 46, 83-88.
- Boyer, H. W., and D. Roulland-Dussoix. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41, 459.
- Brown, A., and J. E. Officer. 1968. Contamination of cell cultures by mycoplasma (PPL0). In: K. Maramorosch and H. Koprowski (eds.), *Methods in Virology*, Vol. 4, pp. 531-564, Academic Press, New York and London.
- Brown, S., M. Teplitz, and J.-P. Revel. 1974. Interaction of mycoplasmas with cell cultures, as visualized by electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 464-468.
- Burke, D. J., and K. Keegstra. 1979. Carbohydrate structure of Sindbis virus glycoprotein E₂ from virus grown in hamster and chicken cells. *J. Virol.* 29, 546-554.
- Burnette, W. N. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112, 195-203.
- Burridge, K. 1978. Direct identification of specific glycoproteins and antigens in sodium dodecyl sulfate gels. In: K. Moldave and L. Grossman (eds.), *Methods in Enzymology* 50, 54-64, Academic Press, New York and London.
- Cameron, J. M., and C. M. Preston. 1981. Comparison of the immediate early polypeptides of human cytomegalovirus isolates. *J. Gen. Virol.* 54, 421-424.
- Chang, A. C. Y., and S. N. Cohen. 1978. Construction and Characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* 134, 1141.

- Chousterman, S., M. Lacasa, and P. Sheldrick. 1981. Physical map of the channel catfish virus genome: location of sites for restriction endonucleases EcoRI, HindIII, HpaI and XbaI. *J. Virol.* 31, 73-85.
- Chua, C. C., T. H. Carter, and S. St. Jeor. 1981. Transcription of the human cytomegalovirus genome in productively infected cells. *J. Gen. Virol.* 56, 1-11.
- Cohen, G. H., M. Katze, C. Hydrean-Stern, and R. J. Eisenberg. 1978. Type-common CP-1 antigen of herpes simplex virus is associated with a 59,000-molecular-weight envelope glycoprotein. *J. Virol.* 27, 172-181.
- Cooper, J. A., R. Wittek, and B. Moss. 1981. Hybridization selection and cell-free translation of mRNA's encoded within the inverted terminal repetition of the vaccinia virus genome. *J. Virol.* 37, 284-294.
- Copeland, N. G., and G. M. Cooper. 1979. Transfection by exogenous and endogenous murine retrovirus DNAs. *Cell* 16, 347-356.
- Craighead, J.-E., R. E. Kanich, and J. D. Almeida. 1972. Non-viral microbodies with viral antigenicity produced in cytomegalovirus-infected cells. *J. Virol.* 10, 766-775.
- Darlington, R. W., and L. H. Moss III. 1968. Herpesvirus envelopment. *J. Virol.* 2, 48-55.
- DeMarchi, J. M., and A. S. Kaplan. 1976. Replication of human cytomegalovirus DNA: lack of dependance on cell DNA synthesis. *J. Virol.* 18, 1063-1070.
- DeMarchi, J. M., and A. S. Kaplan. 1977. Physiological state of human embryonic lung cells affects their response to human cytomegalovirus. *J. Virol.* 23, 126-132.
- DeMarchi, J. M., M. L. Blankenship, G. D. Brown, and A. S. Kaplan. 1978. Size and complexity of human cytomegalovirus DNA. *Virology* 89, 643-646.

- DeMarchi, J. M., C. A. Schmidt, and A. S. Kaplan. 1980. Patterns of transcription of human cytomegalovirus in permissively infected cells. *J. Virol.* 35, 277-286.
- DeMarchi, J. M. 1981. Human cytomegalovirus DNA: restriction enzyme cleavage maps and map locations for immediate-early, early, and late RNAs. *Virology* 114, 23-38.
- Denhardt, D. T. 1966. A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 23, 641-646.
- Dolyniuk, M., E. Wolff, and E. Kieff. 1976. Proteins of Epstein-Barr Virus. II. Electrophoretic analysis of the polypeptides of the nucleocapsid and the glucosamine- and polysaccharid-containing components of enveloped virus, *J. Virol.* 18, 289-297.
- Drew, W. L., R. C. Miner, J. L. Ziegler, J. H. Gullett, D. J. Abrams, M. A. Conant, E. S. Huang, J. R. Groundwater, P. Volberding, and L. Mintz. 1982. Cytomegalovirus and Kaposi's sarcoma in young homosexual men. *The Lancet* 8290, 125-127.
- Ebeling, A., G. Keil, B. Nowak, B. Fleckenstein, N. Berthelot, and P. Sheldrick. 1983. Genome structure and virion polypeptides of the primate herpesviruses Herpesvirus aotus types 1 and 3: Comparison with human cytomegalovirus. *J. Virol.* 45, 715-726.
- Edson, C. M., and D. A. Thorley-Lawson. 1981. Epstein-Barr virus membrane antigens: characterization, distribution, and strain differences. *J. Virol.* 39, 172-184.
- Etchison, J. R., J. S. Robertson, and D. F. Summers. 1977. Partial structural analysis of the oligosaccharide moieties of vesicular stomatitis virus glycoprotein by sequential chemical and enzymatic degradation. *Virology* 78, 375-392.
- Fiala, M., R. W. Honess, D. C. Heiner, J. W. Heine, Jr., J. Murnane, R. Wallace, and L. B. Guze. 1976. Cytomegalovirus proteins. I. Polypeptides of virions and dense bodies. *J. Virol.* 19, 243-254.

- Fleckenstein, B., I. Müller, and J. Collins. 1982. Cloning of the complete human cytomegalovirus genome in cosmids. *Gene* 18, 39-46.
- Furlong, D., H. Swift, and B. Roizman. 1972. Arrangement of herpesvirus deoxyribonucleic acid in the core. *J. Virol.* 10, 1071-1074.
- Furukawa, T., A. Fioreth, and S. Plotkin. 1973. Growth characteristics of cytomegalovirus in human fibroblasts with demonstration of proteins synthesis early in viral replication. *J. Virol.* 11, 991-997.
- Furukawa, T., S. Tanaka, and S. Plotkin. 1975. Stimulation of macromolecular synthesis in guinea pig cells by human CMV. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 148, 211-214.
- Furukawa, T. 1979. Persistent infection with human cytomegalovirus in a lymphoblastoid cell line. *Virol.* 94, 214-218.
- Garnett, H. M. 1979. Fusion of cytomegalovirus infected fibroblasts to form multinucleate giant cells. *J. Med. Virol.* 3, 271-274.
- Garrels, J. I., and W. Gibson. 1976. Identification and characterization of multiple forms of actin. *Cell* 9, 793-805.
- Geelen, J. L. M. C., C. Walig, P. Wertheim, and J. van der Noordaa. 1978. Human cytomegalovirus DNA. I. Molecular weight and infectivity. *J. Virol.* 26, 813-816.
- Ghosh, H. P. 1980. Synthesis and maturation of glycoproteins of enveloped animal viruses. *Rev. Infect. Dis.* 2, 26-39.
- Gibson, W. 1981. Immediate-early proteins of human cytomegalovirus strains AD169, Davis, and Towne differ in electrophoretic mobility. *Virology* 112, 350-354.
- Gilham, P. T. 1964. Synthesis of polynucleotide celluloses and their use in the fractionation of polynucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* 84, 4982.

- Giraldo G., E. Beth, and E. S. Huang. 1980. Kaposi's sarcoma and its relationship to cytomegalovirus (CMV) III. CMV DNA and CMV early antigens in Kaposi's sarcoma. *Int. J. Cancer* 26, 23-29.
- Goldstein, I. J., C. E. Hollerman, and E. E. Smith. 1965. Protein-carbohydrate interaction. II. Inhibition studies on the interaction of concanavalin A with polysaccharides. *Biochem.* 4, 876-883.
- Goldstein, L. C., J. McDougall, R. Hackman, J. D. Meyers, E. D. Thomas, and R. C. Nowinski. 1982. Monoclonal antibodies to cytomegalovirus: rapid identification of clinical isolates and preliminary use in diagnosis of cytomegalovirus pneumonia. *Infect. Immun.* 38, 273-281.
- Graham, F. L., and A. J. van der Eb. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 456-467.
- Graham, F. L., A. J. van der Eb, and H. L. Heijneker. 1974. Size and location of the transforming region in human adenovirus type 5 DNA. *Nature*, 251, 687-691.
- Greenaway, P. J., J. D. Oram, R. G. Downing, and K. Patel. 1982. Human cytomegalovirus DNA: BamHI, EcoRI and PstI restriction endonuclease cleavage maps. *Gene* 18, 355-360.
- Gupta, P., S. St. Jeor, and F. Rapp. 1977. Comparison of the polypeptides of several strains of human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* 34, 447-454.
- Gurney, E. G., R. O. Harrison, and J. Fenno. 1980. Monoclonal antibodies against simian virus 40 T antigens: evidence for distinct subclasses of large T antigen and for similarities among nonviral T antigens. *J. Virol.* 34, 752-763.
- Hanshaw, J. B., A. P. Sheiner, A. W. Moxley, L. Gaev, and V. Abel. 1975. CNS sequelae of congenital cytomegalovirus infection. In: S. Krugman and A. A. Gershon (eds.), *Infections of the fetus and newborn infant*, pp. 47-54, Alan R. Liss, New York.

- Hanshaw, J. B., and J. A. Dudgeon. 1978. Congenital cytomegalovirus. In: A. J. Schaffer and M. Markowitz (eds.), *Viral diseases in the fetus and newborn*, pp. 97-152, Saunders, Philadelphia.
- Hashiro, G. M., S. Horikami, and P. C. Loh. 1979. Cytomegalovirus isolation from cell cultures of human adenocarcinomas of the colon. *Interviol.* 12, 84-88.
- Hohn, B., and J. Collins. 1980. A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments. *Gene* 11, 291-298.
- Holmes, D. S., and M. Quigley. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114, 193-197.
- Honess, R. W., and B. Roizman. 1973. Proteins specified by herpes simplex virus. XI. Identification and relative molar rates of synthesis of structural and non-structural herpesvirus polypeptides in infected cells. *J. Virol.* 12, 1347-1365.
- Honess, R. W., and B. Roizman. 1974. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J. Virol.* 14, 8-10.
- Honess, R. W., and B. Roizman. 1975. Proteins specified by herpes simplex virus. XIII. Glycosylation of viral polypeptides. *J. Virol.* 16, 1308-1326.
- Horwitz, C. A., W. Henle, G. Henle, H. Polesky, H. H. Balfour, Jr., R. A. Siem, S. Borken, and P. C. J. Ward. 1977. Heterophile-negative infectious mononucleosis and mononucleosis-like illnesses. *Am. J. Med.* 63, 947-957.
- Huang, A. S., and D. Baltimore. 1977. Defective interfering animal viruses. In: H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner (eds.), *Comprehensive Virology*, Vol. 10, pp. 73-116, Plenum Press, New York.
- Huang, E. S., S. T. Chen, and J. S. Pagano. 1973. Human cytomegalovirus. I. Purification and characterization of viral DNA. *J. Virol.* 12, 1473-1481.

- Huang, E. S., and J. S. Pagano. 1974. Human cytomegalovirus. II. Lack of relatedness to DNA of herpes simplex I and II, Epstein-Barr virus, and nonhuman strains of cytomegalovirus. *J. Virol.* 13, 642-645.
- Huang, E. S., B. A. Kilpatrick, Y. T. Huang, and J. S. Pagano. 1976. Detection of human cytomegalovirus and analysis of strain variation. *Yale J. Biol. Med.* 49, 29-43.
- Huang, E. S., M. Leyritz, J. Menezes, and J. H. Joncas. 1978. Persistence of both human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus genomes in two human lymphoblastoid cell lines. *J. Gen. Virol.* 40, 519-529.
- Huang, E. S., and J. K. Roche. 1978. Cytomegalovirus DNA and adenocarcinoma of the colon: evidence for latent viral infection. *The Lancet* 8071, 957-960.
- Hunt, L. A., S. E. Wright, J. R. Etchison, and D. F. Summers. 1979. Oligosaccharide chains of avian RNA tumor virus glycoproteins contain heterogenous oligomannosyl cores. *J. Virol.* 29, 336-343.
- Jahn, G., E. Knust, H. Schmolla, T. Sarre, J. A. Nelson, J. K. McDougall, and B. Fleckenstein. 1984. Predominant immediate-early transcripts of human cytomegalovirus strain AD169, *J. Virol.* in press.
- Joncas, J. H., J. Menezes, and E. S. Huang. 1975. Persistence of CMV genome in lymphoid cells after congenital infection. *Nature* 258, 432-434.
- Kearney, J. F., A. Radbruch, B. Liesegang, and K. Rajewsky. 1980. A new mouse myeloma cell line that lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J. Immunol.* 34, 752-763.
- Kessler, S. W. 1975. Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A-antibody absorbant: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. *J. Immunol.* 15, 1617-1624.

- Kilpatrick, B. A., and E. S. Huang. 1977. Human cytomegalovirus genome: partial denaturation map and organization of genome sequences. *J. Virol.* 24, 261-276.
- Kim, K. S., V. Sapienza, R. I. Carp, and H. M. Moon. 1976. Analysis of structural proteins of purified human cytomegalovirus. *J. Virol.* 20, 604-611.
- Klemola, E., R. Stenstrom, and R. Essen. 1972. Pneumonia as a clinical manifestation of cytomegalovirus infection in previously healthy adults. *Scand. J. Infect. Dis.* 4, 7-10.
- Klemola, E. 1973. Cytomegalovirus infection in previously healthy adults. *Ann. Intern. Med.* 79, 267-268.
- Köhler, G. 1980. Hybridoma Techniques. Cold Spring Harbor Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 21-25.
- Krusius, T., J. Finne, and H. Rauvala. 1976. The structural basis of the different affinities of two types of acidic N-glycosidic glycopeptides for concanavalin A-sepharose. *FEBS Lett.* 71, 117.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- LaFemina, R. L., and G. S. Hayward. 1980. Structural organization of the DNA molecules from human cytomegalovirus, In: R. Jaenisch, B. Fields, and C. F. Fox (eds.), *Animal virus genetics*, pp. 39-55, Academic Press, New York.
- Lakeman, A. D., and J. E. Osborn. 1979. Size of infectious DNA from human and murine cytomegalovirus. *J. Virol.* 30, 414-416.
- Lang, D. J. 1975. The epidemiology of cytomegalovirus infections: interpretation of recent observations. In: S. Krugman and A. A. Gershon (eds.), *Infections of the fetus and newborn infant*, pp. 35-45, Alan R. Liss, New York.

- Lazarides, E., and K. Weber. 1974. Actin antibody: the specific visualization of actin filaments in non-muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 2268-2272.
- Levine, E. M., L. Thomas, D. McGregor, L. Hayflick, and H. Eagle. 1969. Altered nucleic acid metabolism in human cell cultures infected with mycoplasma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 60, 583-589.
- Levy, R., J. Dilley, and L. A. Lampson. 1978. Human normal and leukemia cell surface antigens; mouse monoclonal antibodies as probes. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 81, 164.
- Liu, C.-P., D. L. Slate, R. Gravel, and F. H. Ruddle. 1979. Biological detection of specific mRNA molecules by microinjection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4503-4506.
- Lodish, H. F., D. Wirth, and M. Porter. 1980. Synthesis and assembly of viral membrane proteins. In: M. Zimmerman, R. A. Mumford, and D. F. Steiner (eds.), *Precursor processing in the biosynthesis of proteins*, Vol. 343, pp. 319-337, *Annals of the New York Academy of Sciences*.
- Lohmeyer, J., and H.-D. Klenk. 1979. A mutant of influenza virus with a temperature-sensitive defect in the posttranslational processing of the hemagglutinin. *Virology* 93, 134-145.
- Maio, J. J. 1971. DNA strand reassociation and polyribonucleotide binding in the african green monkey, *cercopithecus aethiops*. *J. Mol. Biol.* 56, 579-595.
- Manservigi, R., P. G. Spear, and A. Buchan. 1977. Cell fusion induced by herpes simplex virus is promoted and suppressed by different viral glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 3913.
- McDonough, S. H., and D. H. Spector. 1983. Transcription in human fibroblasts permissively infected by human cytomegalovirus strain AD169, *Virology* 125, 31-46.

- McMaster, G. K., and G. G. Carmichael. 1977. Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 4835-4838.
- Melnick, J. L., R. Lewis, I. Wimberly, R. H. Kaufmann, and E. Adam. 1978. Association of cytomegalovirus (CMV) infection with cervical cancer: Isolation of CMV from cell cultures derived from cervical biopsy. *Intervirology* 10, 115-119.
- Messing, J. 1981. Third Cleveland Symposium on Macromolecules: Recombinant DNA, Ed. A. Walter, Elsevier, Amsterdam, pp. 143-153.
- Messing, J., R. Crea, and P. H. Seeburg. 1981. A system for shot-gun DNA sequencing. *Nucleic Acids Res.* 9, 309.
- Meyers, J. D., N. Flournoy, E. D. Thomas. 1980. Cytomegalovirus infection and specific cell-mediated immunity after marrow transplant. *J. Infect. Dis.* 142, 816-824.
- Miller, J. H. ed. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Morse, L. S., L. Pereira, B. Roizman, and P. A. Schaffer. 1978. Anatomy of herpes simplex virus (HSV) DNA. Mapping of viral genes by analysis of polypeptides and functions specified by HSV-1 x HSV-2 recombinants. *J. Virol.* 26, 389-410.
- Müller-Lantzsch, N., B. Georg, N. Yamamoto, and H. zur Hausen. 1980. Epstein-Barr virus-induced proteins. II. Analysis of surface polypeptides from EBV-producing and superinfected cells by immunoprecipitation. *Virology* 102, 401-411.
- Nakamura, K., and R. W. Compans. 1978. Glycopeptide components of influenza viral glycoproteins. *Virology* 86, 432-472.

- Nelson, J. A., B. Fleckenstein, D. A. Galloway, and J. K. McDougall. 1982. Transformation of NIH 3T3 cells with cloned fragments of human cytomegalovirus strain AD169. *J. Virol.* 43, 83-91.
- Nelson, J. A., B. Fleckenstein, G. Jahn, D. A. Galloway, and J. K. McDougall. 1983. Cytomegalovirus transformation: structure of the transforming region of human cytomegalovirus strain AD169. *J. Virol.* in press.
- Norrild, B., O. J. Bjerrum, H. Ludwig, and B. F. Vestergaard. 1978. Analysis of herpes simplex virus type 1 antigens exposed on the surface of infected tissue culture cells. *Virology* 87, 307-316.
- Norrild, B., S. L. Shore, and A. J. Nahmias. 1979. Herpes simplex virus glycoproteins. Participation of individual herpes simplex virus type 1 glycoprotein antigens in immunocytolysis and their correlation with previously identified glycopolypeptides. *J. Virol.* 32, 741-748.
- Norrild, B., S. L. Shore, T. L. Cromeans, and A. J. Nahmias. 1980. Participation of three major glycoprotein antigens of herpes simplex virus type 1 early in the infectious cycle as determined by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Inf. Immun.* 28, 38-44.
- Nowak, B., C.A. Sullivan, P. Sarnow, R. Thomas, F. Bricout, J.-C. Nicolas, B. Fleckenstein, and A. J. Levine. 1984. Characterization of monoclonal antibodies and polyclonal immune sera directed against human cytomegalovirus virion proteins. *Virology*, in press.
- O'Farrell, P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021.
- Ogata, S., T. Muramatsu, and A. Kobata. 1975. Fractionation of glycopeptides by affinity column chromatography on concanavalin A-sepharose. *J. Biochem. Tokyo* 78, 687.
- Olshevsky, U., and Y. Becker. 1972. Surface glycopeptides in the envelope of herpes simplex virions. *Virology* 50, 277-279.

- Para, M. F., R. B. Baucke, and P. G. Spear. 1982. gE of herpes simplex virus type 1: effects of anti-gE on virion infectivity and on virus-induced Fc-binding receptors. *J. Virol.* 41, 129-136.
- Pauls, F. P., and W. R. Dowdle. 1967. A serological study of herpesvirus hominis strains by microneutralization tests. *J. Immunol.* 98, 941-947.
- Peden, K., P. Mounts, and G. S. Hayward. 1982. Homology between mammalian cell DNA sequences and human herpesvirus genomes detected by a hybridization procedure with high-complexity probes. *Cell* 31, 71-80.
- Pelham, H. R. B., and R. J. Jackson. 1976. An efficient mRNA-dependant translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.* 67, 247-256.
- Pereira, L., M. Hoffmann, D. Gallo, and N. Cremer. 1982. Monoclonal antibodies to human cytomegalovirus: three surface membrane proteins with unique immunological and electrophoretic properties specify cross-reactive determinants. *Infect. Immun.* 36, 924-932.
- Pesonen, M., and O. Renkonen. 1976. Serum glycoprotein-type sequence of monosaccharides in membrane glycoproteins of Semliki Forest virus. *Biochim. Biophys. Acta* 455, 510-525.
- Plotkin, S. A., T. Furukawa, N. Zygraich, and C. Huygelen. 1975. Candidate cytomegalovirus strain for human vaccination. *Infect. Immun.* 12, 521-527.
- Powell, K., and R. Courtney. 1975. Polypeptides synthesized in herpes simplex virus type 2-infected HEP-2 cells. *Virology* 66, 217-228.
- Ramirez, M. L., M. Virmani, C. Garon, and L. J. Rosenthal. 1979. Defective virions of human cytomegalovirus. *Virology* 96, 311-314.
- Rapp, F., and L. Geder. 1980. Herpesviruses and cancer. In: E. Spring-Mills and E. S. E. Hafez (eds.), *Male accessory sex glands*, pp. 327-340, Elsevier/North Holland Biomedical Press.

- Reller, L. B. 1973. Granulomatous hepatitis associated with acute cytomegalovirus infection. *Lancet* 1, 20-22.
- Ricciardi, R. P., J. S. Miller, and B. E. Roberts. 1979. Purification and mapping of specific mRNAs by hybridisation-selection and cell-free translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4927-4931.
- Rigby, P. N. J., M. Dieckmann, C. Rhoades, and P. Berg. 1977. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity by nick-translation with polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113, 237-251.
- Rinaldo, C. R., Jr., M. J. Levin, W. P. Carney, P. H. Black, and M. S. Hirsch. 1979. Interaction of lymphocytes with cytomegalovirus. In: M. R. Proffitt (ed.), *Virus-lymphocyte interactions: implications for disease*, pp. 267-282, Elsevier/ North Holland, Amsterdam.
- Roberts, R. 1982. Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. *Nucleic Acids Res.* 10, R117.
- Roizman, B., and P. G. Spear. 1971. In "Nucleic Acid- Protein Interactions- Nucleic Acid Synthesis in viral infection" (D. W. Ribbons, J. F. Woessner, and J. Schultz, eds.), pp. 435-460. North Holland, Amsterdam and London.
- Roizman, B., and D. Furlong. 1974. The replication of herpesviruses. In: H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner (eds.), *Comprehensive Virology*, Vol. 3, pp. 229-403, Plenum, New York.
- Roizman, B., and L. S. Morse. 1978. Human herpesvirus 1 as a model of regulations of herpesvirus macromolecular metabolism: A review. In *Oncogenesis and Herpesviruses*, III, *IARC Sci. Publ.* 24 (pt. 1), pp. 269-297.
- Rowe, W. P., J. W. Hartley, S. Waterman, H. C. Turner, and R. J. Huebner. 1956. Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 92, 418-424.

- Rüger, R., G. W. Bornkamm, and B. Fleckenstein. 1983. Human cytomegalovirus DNA sequences with homologies to the cellular genome. *J. Virol.* in press.
- Saral, R. 1979. Herpesvirus infections following bone marrow transplantation. In: *Experimental Herpesvirus Vaccine Workshop proceedings*, Bethesda, Md.: Bureau of Biologics and National Institutes of Health, 123-9.
- Sarmiento, M., M. Haffey, and P. G. Spear. 1979. Membrane proteins specified by herpes simplex viruses. III. Role of glycoprotein VP7 (B₂) in virion infectivity. *J. Virol.* 29, 1149-1158.
- Sarnow, P., Y. S. Ho, J. Williams, and A. J. Levine. 1982. Adenovirus Elb-58Kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells. *Cell* 28, 387-394.
- Sarov, I., and I. Abady. 1975. The morphogenesis of human cytomegalovirus. Isolation and polypeptide characterization of cytomegalovirus and dense bodies. *Virology* 66, 464-473.
- Schmitz, H., N. Müller-Lantzsch, and G. Peteler. 1980. Human immune response to proteins of cytomegalovirus. *Intervirology* 13, 154-161.
- Schwartz, J., and B. Roizman. 1969. Concerning the egress of herpes simplex virus from infected cells: electron and light microscope observations. *Virology* 38, 42-49.
- Schwarz, R. T., B. Fournet, J. Montreuil, R. Rott, and H.-D. Klenk. 1978. The carbohydrates of influenza virus. II. Gas chromatographic analysis of glycopeptides derived from viral glycoproteins and mucopolysaccharides. *Arch. Virol.* 54, 251-255.
- Siddell, S. G., H. Wege, A. Barthel, and V. ter Meulen. 1980. Coronavirus JHM: cell-free synthesis of structural protein p60. *J. Virol.* 33, 10-17.

- Simmons, R. L., A. J. Matas, L. C. Rattazzi, H. H. Balfour, Jr., R. J. Howard, and J. S. Najarian. 1977. Clinical characteristics of the lethal cytomegalovirus infection following renal transplantation. *Surgery* 82, 537-546.
- Siqueira-Linhares, M. I., N. Faucon-Biguet, Y. Chardonnet, and J. P. Revillard. 1981. Polypeptides and major antigens of four new isolates of cytomegalovirus. *Med. Microbiol. Immunol.* 169, 197-208.
- Smith, J. D., and E. DeHarven. 1973. Herpes simplex virus and human cytomegalovirus replication in WI-38 cells. I. Sequences of viral replication. *J. Virol.* 12, 919-930.
- Sober, H. A. (ed.). 1970. "Handbook of biochemistry with selected data for Molecular Biology", The Chemical Rubber Co., Cleveland.
- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- Spear, P. G., J. M. Keller, and B. Roizman. 1970. The proteins specified by herpes simplex virus. II. Viral glycoproteins associated with cellular membranes. *J. Virol.* 5, 123-131.
- Spear, P. G. 1980. Herpesviruses. In: H. A. Blough and J. M. Tiffany (eds.), *Cell membranes and viral envelopes* 2, Academic Press, London.
- Spector, D. H., and J. P. Vacquier. 1983. Human cytomegalovirus (strain AD169) contains sequences related to the avian retrovirus oncogene v-myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 3889-3893.
- Spencer, E. S. 1974. Clinical aspects of cytomegalovirus infection in kidney-graft recipients. *Scand. J. Infect. Dis.* 6, 315-323.
- Stagno, S., R. F. Pass, M. E. Dworsky, R. E. Henderson, E. G. Moore, P. D. Walton, and G. A. Alford. 1982. Congenital cytomegalovirus infection: the relative importance of primary and recurrent maternal infection. *N. Engl. J. Med.* 306, 945-949.

- Stalder, H., and A. Ehrensberger. 1980. Microneutralization of cytomegalovirus. *J. Infect. Dis.* 142, 102-105.
- Stanbridge, E. 1971. Mycoplasmas and cell cultures. *Bacteriol. Rev.* 35, 206-227.
- Starr, S. E. 1979. Cytomegalovirus. *Pediatr. Clin. North Am.* 26, 283-293.
- Stinski, M. F. 1976. Human cytomegalovirus: glycoproteins associated with virions and dense bodies. *J. Virol.* 19, 594-609.
- Stinski, M. F. 1977. Synthesis of proteins and glycoproteins in cells infected with human cytomegalovirus. *J. Virol.* 23, 751-767.
- Stinski, M. F. 1978. Sequence of protein synthesis in cells infected by human cytomegalovirus: early and late virus-induced polypeptides. *J. Virol.* 26, 686-701.
- Stinski, M. F., E. S. Mocarski, and D. R. Thomsen. 1979. DNA of human cytomegalovirus: size heterogeneity and defectiveness resulting from serial undiluted passage. *J. Virol.* 31, 231-239.
- Stinski, M. F., D. R. Thomsen, and M. W. Wathen. 1980. Structure and function of the cytomegalovirus genome. In: A. Nahmias, W. R. Dowdle, and R. F. Schinazi (eds.), *Human herpesviruses*, pp. 72-84, Elsevier/North Holland Publishing Co., New York.
- Stinski, M. F., D. R. Thomsen, R. M. Stenberg, and L. C. Goldstein. 1983. Organization and expression of the immediate early genes of human cytomegalovirus. *J. Virol.* 46, 1-14.
- St. Jeor, S. C., T. B. Albrecht, F. D. Funk, and F. Rapp. 1974. Stimulation of cellular DNA synthesis by human cytomegalovirus. *J. Virol.* 13, 353-362.
- St. Jeor, S. C., and R. Hutt. 1977. Cell DNA replication as a function in the synthesis of human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* 37, 65-73.

- Tanaka, S., T. Furukawa, and S. A. Plotkin. 1975. Human cytomegalovirus-stimulated host cell DNA synthesis. *J. Virol.* 15, 297-304.
- The, T. H., and M. M. A. C. Langenhuisen. 1972. Antibodies against membrane antigens of cytomegalovirus infected cells in sera of patients with a cytomegalovirus infection. *Clin. Exp. Immunol.* 11, 475-482.
- The, T. H., G. Klein, and M. M. A. C. Langenhuisen. 1974. Antibody reactions to virus-specific early antigens (EA) in patients with cytomegalovirus (CMV) infection. *Clin. Exp. Immunol.* 16, 1-12.
- The, T. H., N. K. Anderson, E. S. Spencer, and G. Klein. 1977. Antibodies against cytomegalovirus-induced early antigens (CMV-EA) in immunosuppressed renal allograft recipients. *Clin. Exp. Immunol.* 28, 502-505.
- Thomas, P. S. 1980. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 5201-5205.
- Thorley-Lawson, D. A., and C. A. Poodry. 1982. Identification and isolation of the main component (gp350-gp220) of Epstein-Barr virus responsible for generating neutralizing antibodies in vivo. *J. Virol.* 43, 730-736.
- Tocci, M. J., and S. C. St. Jeor. 1979. Persistence and replication of the human cytomegalovirus genome in lymphoblastoid cells of B and T origin. *Virology* 96, 664-668.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.
- Wathen, M. W., D. R. Thomsen, and M. F. Stinski. 1981. Temporal regulation of human cytomegalovirus: transcription at immediate early and early times after infection. *J. Virol.* 38, 446-459.

- Wathen, M. W., and M. F. Stinski. 1982. Temporal patterns of human cytomegalovirus transcription: mapping the viral RNAs synthesized at immediate early, early, and late times after infection. *J. Virol.* 41, 462-477.
- Weller, T. H. 1970. Cytomegalovirus: the difficult years. *J. Infect. Dis.* 122, 532-539.
- Weller, T. H. 1971. The cytomegalovirus: ubiquitous agents with protean clinical manifestations. *N. Engl. J. Med.* 285, 203-214, 267-274.
- Wertheim, P., and P. A. Voute. 1976. Neuroblastoma, Wilms' tumor, and cytomegalovirus. *J. Natl. Cancer Inst.* 57, 701-703.
- Weststrate, M. W., J. L. M. Geelen, and J. van der Noordaa. 1980. Human cytomegalovirus DNA: physical maps for the restriction endonucleases BglII, HindIII and XbaI. *J. Gen. Virol.* 49, 1- 21.
- Wildy, P., W. C. Russell, and R. W. Horne. 1960. The morphology of herpesvirus. *Virology* 12, 204-222.

Herrn Prof. Dr. B. Fleckenstein danke ich für die Überlassung des Themas und ihm und allen Mitarbeitern des Instituts für Klinische Virologie für die freundliche und stets gewährte Hilfe.

Herrn Prof. Arnie J. Levine danke ich herzlich für sein großes Interesse und seine Hilfsbereitschaft. Ebenso danke ich C. A. Sullivan, A. Teresky und C. Anderson.

Vor allem bedanke ich mich bei A. Gmeiner und H.-P. Sarnow für ihre hervorragende und freundschaftliche Unterstützung.

Diese Arbeit wurde durch das Bundesministerium für Forschung und Technologie gefördert.

Lebenslauf

- | | |
|--------------|--|
| 15. 02. 1956 | geb. in Rheine, Nordrhein-Westfalen |
| 1962-1966 | Besuch der Albert-Schweitzer-Grundschule in Iserlohn |
| 1966-1974 | Besuch des Neusprachlichen Mädchengymnasiums in Iserlohn |
| Juni 1974 | Reifeprüfung |
| 1974-1978 | Studium der Biologie an der Universität Konstanz |
| 1978-1979 | Studium der Medizin an der Ruhr-Universität in Bochum |
| 1979 | Diplom der Biologie an der Universität Konstanz |
| 1979-1980 | Studium der Medizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen |
| 1980-1983 | Promotionsarbeit am Institut für klinische Virologie der Universität Erlangen-Nürnberg |

Barbara Nowak

